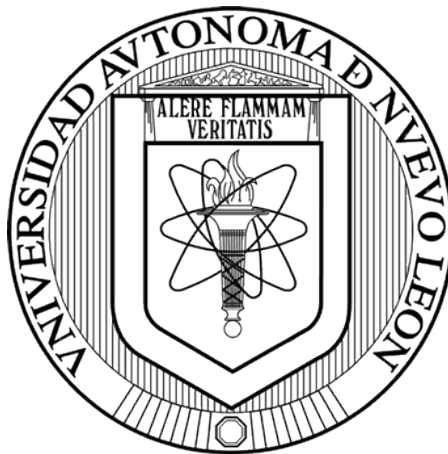


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (TUMOR DE WILMS) EN
MELANOMA EQUINO**

QUE PRESENTA:

OSCAR IGNACIO GARZA RODRÍGUEZ

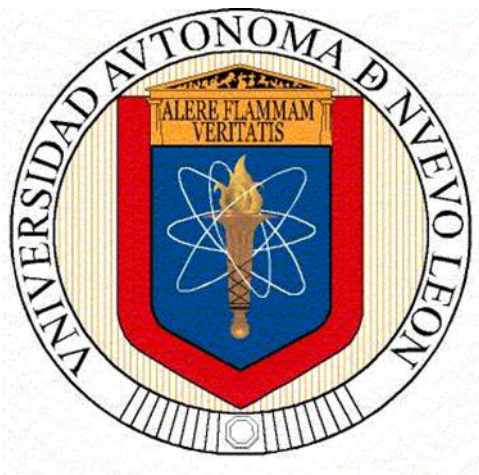
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

ABRIL 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA



Tesis

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilms)
EN MELANOMA EQUINO**

PRESENTADA POR:

MVZ.OSCAR IGNACIO GARZA RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

ESCOBEDO, Nuevo León, México ABRIL 2015

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilms) EN MELANOMA EQUINO

Comité de tesis



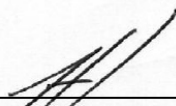
Director

Dra. Diana Eliza Zamora Ávila



Director externo

Dr. Pablo Zapata Benavides



Co-Asesor

M.C. Armando Trejo Chávez



Co- Asesor

Dra. Sibilina Cedillo Rosales



Co- Asesor

Dr. Juan José Zarate Ramos

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Departamento de Biología Molecular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL bajo la dirección de la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila y codirección del Dr. Pablo Zapata Benavides.

DEDICATORIA

Primero a nuestro Dios, porque Él es el que nos guía en el camino de la vida.

A mi familia, mis padres Teresa de Jesús Rodríguez Rodríguez y Juan Manuel Garza Guzmán y mi hermano Juan Manuel Garza Rodríguez, Gracias porque siempre me apoyaron en las buenas y en las malas.

A mi Amor Itzel por haberme apoyado en todos y cada uno de los momentos de mi vida y siempre haberme motivado a ser una mejor persona y superarme, también por haberme apoyado con tu grandísima ayuda en la elaboración de esta tesis.

A la Doctora Diana por motivarme siempre a ser mejor persona y un mejor estudiante y haberme confiado este proyecto tan importante y siempre estar al pendiente de mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el apoyo recibido durante mis estudios de Postgrado ya que gracias a esto ha sido posible lograr una meta más en mi desarrollo profesional.

A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila y al Dr. Pablo Zapata Benavides por haberme confiado este proyecto tan importante, y siempre estar al pendiente de la elaboración de esta tesis y apoyarme con valiosos consejos personales y laborales porque me han hecho un mejor estudiante.

A la MVZ. Itzel Yanina Rangel Sánchez por todo el apoyo en su colaboración y participación en este proyecto.

Al MC. Armando Trejo Chávez por apoyarme en la realización y descripción de todos los cortes histológicos ya que con esta ayuda pude comprender mucho estos tejidos y encontrar cosas muy impresionantes.

Al Dr. Uziel Castillo Velázquez porque siempre apoyarme con su amistad, conocimiento y facilitarme muchos materiales del laboratorio.

A Felipe Torres del Muro por su amistad y gran apoyo que incondicionalmente nos brindó en la elaboración de la parte de inmunohistoquímica.

Al laboratorio de Genética y a Fany que es la encargada, porque siempre me apoyo y aconsejo con el proyecto.

Al laboratorio de Biología Molecular del Cáncer y a mis compañeros de este laboratorio porque siempre me apoyaron con su valioso tiempo y conocimiento y también porque han sido muy importantes en mi vida.

A mis amigas y amigo compañeros de maestría, Cecy, Patra, y Eliud por su amistad y siempre apoyarme en los momentos personales y escolares.

INDICE DE CONTENIDO

LUGAR DE TRABAJO	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDO	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE GRAFICAS	viii
NOMENCLATURA	ix
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HIPOTESIS.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	3
1.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Cáncer	4
2.1.1. Genética y cáncer	4
2.2. Cáncer en animales	5
2.3. Cáncer en equinos.....	6
2. 4. Melanoma en equinos	8
2.4.1. Genes y proteínas relacionadas con los melanomas analizados en equinos.....	11
2. 5. Melanoma en Humanos	18
2.5.1. Genes involucrados en el melanoma humano.....	19
2.6. El gen del Tumor de Wilms (WT1).....	21
2. 6.1. WT1 y embriogénesis	21
2.6.2. Estructura del Gen WT1	21
2.6.3. Secuencia del Gen WT1 en equinos	23

2.6.4. WT1 como oncogén	24
2.6.5. Inmunohistoquímica de WT1.....	26
3. MATERIAL Y METODOS	29
3.1. Diseño experimental	29
3.2. Recolección de muestras	30
3.3. Análisis histológico por tinción H&E	31
3.4. Extracción de ADN a partir de sangre	31
3.4.1. Técnica de Wizard® Genomic DNA Purification Kit.....	31
3.5. Extracción de ARN a partir de tejido	32
3.5.1. Técnica de Trizol (TRIzol ® Reagent, Life Technologies).....	32
3.6. Síntesis del ADN complementario (ADNc)	33
3.7. PCR del ADNc para β -actina y expresión total de WT1.....	33
3.8. Extracción y cuantificación de proteínas	34
3.9. DOT BLOT	35
3.10. Inmunohistoquímica y el Índice Binario de reactividad.....	35
3.10.1. Índice binario de reactividad (IBR)	37
3.11. Análisis estadístico	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Análisis histológico mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina de las muestras de melanoma y tejido normal de equinos	38
4.1.1. Análisis histológico de melanomas	38
4.1.2. Análisis histológico de Riñón.....	42
4.1.3. Análisis histológico de Piel normal	43
4.2. RT-PCR para β -actina y expresión total de WT1	44
4.3. Análisis de expresión de la proteína de WT1 por DOT BLOT	44
4.4. Análisis de expresión de la proteína de WT1 por Inmunohistoquímica	47
5. DISCUSIÓN.....	52
6. CONCLUSIONES	55
7. LITERATURA CITADA.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Método de obtención de IBR	37
Tabla 2. Cuantificación de proteínas.....	45
Tabla 3. Estándares y sus valores de absorbancia.	45
Tabla 4. IBR obtenido para las muestras de piel normal, melanoma y riñón.....	50

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura de WT1.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2. Diseño experimental.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3. Extraccion de ADN de sangre.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 4. Hallazgos histológicos en melanomas. Vasos sanguíneos.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 5. Hallazgos histológicos en melanomas Melanosomas.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 6. Hallazgos histológicos en melanomas Trombos</i>	<i>40</i>
<i>Figura 7. Hallazgos histológicos en melanomas. Cantidad de melanina presente en dermis</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8. Hallazgos histológicos en melanomas. Fibras musculares.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 9. Hallazgos histológicos en melanomas. Glándulas sebáceas.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 10. Riñones. Glomérulos</i>	<i>42</i>
<i>Figura 11. Riñón. Túbulos contorneados proximales y distales.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 12. Piel. Folículos pilosos.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 13 Piel. Folículos pilosos y Glándulas sebáceas.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 14. RT-PCR para WT1 y B-actina.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 15. Revelado de la Técnica DOT BLOT para B-actina y WT1.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 16. Inmunohistoquímica para WT1 en muestras de melanomas de equinos.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 17. Inmunohistoquímicas para WT1 en muestras de piel normal de equinos</i>	<i>48</i>
<i>Figura 18. Inmunohistoquímica para WT1 en muestras de riñón de equinos.....</i>	<i>49</i>

INDICE DE GRAFICAS

<i>Grafica 1. Curva de calibración de proteínas.</i>	<i>45</i>
<i>Grafica 2. Expresión de WT1 por IHQ en piel, melanoma y riñón de equino.</i>	<i>51</i>

NOMENCLATURA

μg	microgramo
μl	microlitro
AA	aminoácido
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
B16F10	línea celular de melanoma murino
°C	grados Celsius
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
gr	gramo
hrs	horas
IL	interleucinas
IV	intravenosa
KTS	lisina-treonina-serina
K562	línea celular leucémica humana
Min.	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramo
nt	nucleótidos
OH	Hidroxilo
pb	pares de bases

PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEI	polietilenimina
pH	potencial de hidrogeno
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
Rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa reversa
SDS	duodecil sulfato de sodio
Taq	polimerasa de <i>Termophilus acuaticus</i>
UV	ultravioleta
Vol.	volúmenes
WT1	gen del Tumor de Wilms

RESUMEN

El melanoma es el segundo tumor más frecuente en la piel del equino con una prevalencia de hasta 80% en pacientes mayores a 15 años de edad. En el humano, se han estudiado genes candidatos como biomarcadores y blancos terapéuticos para esta neoplasia entre los cuales destaca el gen WT1 (Tumor de Wilms), el cual se ha encontrado sobreexpresado en melanoma y no en piel normal, además su silenciamiento en una línea de melanoma murino induce una disminución en la proliferación celular y apoptosis, sin embargo, el papel biológico de este gen en el melanoma equino no ha sido estudiado.

El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión del gen WT1 en muestras de melanoma de equino para dilucidar el papel que desempeña en este tipo de neoplasia, para lo cual se analizó la expresión de WT1 en muestras de riñón como control y en biopsias de melanoma y piel sana por RT-PCR, DOT BLOT e inmunohistoquímica.

Los resultados obtenidos muestran expresión de WT1 en piel sana con un IBR en la inmunohistoquímica de 8.25, específicamente en el folículo piloso y en glándula sebácea así como en el riñón específicamente en el glomérulo con un IBR de 3 y las muestras de melanomas fueron negativas.

Estos resultados sugieren una posible represión del gen WT1 en melanoma equino para lo cual es necesario ampliar el número de muestras de piel sana y melanoma para corroborar los resultados y analizar la interacción de otros genes que pudieran actuar como represores de WT1 en este tipo de neoplasia.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se define como el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales en un organismo. Existe una gran variedad de neoplasias, sin embargo el melanoma en humanos representa sólo el 4% de todos los tumores malignos de la piel, es responsable, aproximadamente del 80% de todas las muertes por cáncer de la piel, en las últimas décadas, su incidencia ha aumentado considerablemente en el mundo y se ha convertido en un problema de salud pública. En la especie equina la prevalencia de tumores es relativamente baja (1-3% de todas las patologías en equinos), muy por debajo de la incidencia en humanos y otras especies de animales domésticos. Actualmente se están diagnosticando un mayor número de equinos con cáncer, probablemente la razón es debido a que los equinos están alcanzando un mayor tiempo de vida, lo que permite que se desarrollen procesos oncológicos con mayor frecuencia, también a los cambios sociológicos que han conducido a considerar a los equinos como algo más que solo un animal de trabajo, así como a una mayor capacidad diagnóstica al aplicar a la medicina equina técnicas diagnósticas que parecían limitadas a pequeños animales (estudios citológicos, diagnóstico avanzado por imagen, etc.). El 80% de los tumores en equinos asientan en piel y tejidos subcutáneos, los tres tumores más frecuentes son los sarcoides, carcinomas de células escamosas y melanomas. El melanoma es un tipo de cáncer que se desarrolla en las células productoras de melanina de la piel (melanocitos) y suelen causar metástasis a todos los tejidos del organismo. La problemática del melanoma va más allá del simple aspecto cosmético, los melanomas, e incluso los melanocitomas, pueden presentar cursos agresivos asociados con la disminución de la calidad de vida del animal o con su muerte.

El melanoma cutáneo o mucocutáneo, es el segundo tumor más frecuente descrito de la piel del equino (18% de todas las neoplasias cutáneas). Este tipo de

tumor es el más reportado en los equinos tordillos, estimándose un 70-80% en los caballos mayores de 15 años de edad, los cuales además muestran una alta incidencia de lesiones de tipo vitíligo; teniendo un período de vida reducido, otros tipos de colores de equinos también lo pueden desarrollar, aunque es raro. Las patologías equinas dermatológicas son comúnmente tratadas con cirugía, crioterapia, radiofrecuencia, quimioterapia y/o electro quimioterapia. Hay nuevas formas de estimulación inmunológica con IL-12 intratumoral.

Dentro de la gama de genes estudiados en melanoma de humanos se encuentra el gen WT1, el cual codifica para un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc”, implicado en el desarrollo de diferentes órganos durante el desarrollo embrionario, inicialmente se caracterizó en nefroblastoma como un gen supresor de tumor, sin embargo, actualmente se reconoce más como un oncogén, ya que se ha encontrado sobreexpresado en numerosos tumores en humanos y su expresión se ha asociado con un mal pronóstico y quimioresistencia. El gen WT1 es esencial para la proliferación de las células de melanoma murino B16F10, su silenciamiento con RNA de interferencia inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis y actúa sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos e induce quimiosensibilización a la doxorubicina y cisplatino y en vivo el silenciamiento de WT1 por la administración vía aerosol de complejos PEI-RNAi resulta en una inhibición de la metástasis en pulmón de las células B16F10, aunado a esto, diferentes estudios indican que WT1 es un marcador de malignidad para lesiones melanocíticas, ya que se expresa en melanomas metastásicos e invasivos, pero no así, en piel normal ni en nevos melanocíticos.

El gen WT1 no ha sido estudiado en equinos, por lo que en este trabajo se busca analizar la expresión del mismo en melanomas de equino para determinar el posible papel biológico que pudiera desempeñar en esta especie y en este tipo de neoplasia.

1.1. HIPOTESIS

El gen WT1 se encontrará sobreexpresado en melanoma de equinos, como lo reportado para esta patología en humanos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del gen WT1 en muestras de melanoma de equino para dilucidar el papel que desempeña en este tipo de neoplasia.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Analizar por histopatología las muestras de melanoma de equinos y tejido de piel normal mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina.
- 2.- Determinar la expresión del gen WT1 en muestras de melanoma de equinos y tejido de piel normal mediante RT-PCR.
- 3.- Analizar la expresión de la proteína WT1 en tejido de melanoma equino y tejido de piel normal por DOT BLOT.
- 4.- Analizar la localización de la proteína de WT1 en tejido de melanoma equino y tejido de piel normal mediante Inmunohistoquímica

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer:

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades cuya característica común es el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales llamadas también células tumorales o cancerosas en un organismo. Es causado tanto por factores externos: inhalación de humo, organismos infecciosos, nutrición deficiente, agentes químicos, radiación, etc., como factores internos: mutaciones heredables, factores hormonales, condiciones inmunológicas y cambios que ocurren en el metabolismo (Alberts et al., 2010).

2.1.1. Genética y cáncer:

El cáncer es causado por los cambios heredables en el ADN de las células tumorales. Estos cambios se manifiestan con una mayor expresión, disminución o ausencia de la expresión de las proteínas normales y la expresión de proteínas anormales, disminución o ausencia de la expresión de las proteínas y la expresión de proteínas anormales. Por ejemplo, las proteínas supresoras de tumor, tales como las codificadas por p53, pueden no ser expresadas o pueden expresarse en una forma inactiva. Las proteínas codificadas por oncogenes pueden sobreexpresarse o expresarse en forma constitutivamente activa. El repertorio de proteínas alteradas de la célula tumoral determina su fenotipo. Tales cambios crean células con un potencial ilimitado de proliferación, resistentes a la apoptosis y con capacidad invasiva. Las alteraciones genéticas en la región codificante de un gen pueden dar lugar a la producción de una proteína anormal como resultado de una secuencia codificante alterada o la terminación prematura de la proteína. Sin embargo, los

cambios en otras regiones del genoma también pueden afectar a la secuencia de la proteína codificada y el nivel al que se expresa. Una alteración en la secuencia del sitio de empalme puede dar un mal empalmado (o splicing) del ARN mensajero (ARNm) que se traduce en una proteína aberrante. Debido a que la región no traducida 5' de un gen contiene generalmente su promotor y la región 3' no traducida a menudo contiene motivos estabilizadores del ARNm, alteraciones de la secuencia en estas regiones del genoma también pueden tener efectos en el nivel de expresión génica (Zachary and McGavin, 2013), (Hahn et al., 2009).

En la actualidad se sabe que la angiogénesis desempeña un papel importante en el crecimiento tumoral. Desde la pasada década, la angiogénesis ha sido utilizada como blanco específico para el tratamiento antitumoral. Diversos grupos de investigación describen que la activación de oncogenes y la pérdida de genes supresores tumorales que aparecen junto con los factores de crecimiento y citocinas, contribuyen de forma importante en la angiogénesis tumoral (Chavez-Escamilla, 2013).

2.2. Cáncer en animales:

A pesar de la relativa corta vida de la mayoría de los animales, la neoplasia es una preocupación importante para los veterinarios y los investigadores. El diagnóstico del tumor y el tratamiento individual de los animales se están convirtiendo en una parte cada vez más importante de la práctica. En los animales para abasto, las causas infecciosas y ambientales del cáncer pueden tener un impacto importante en la salud de la manada o de la parvada. Por otra parte, los modelos animales proporcionan pistas importantes sobre la causa y el tratamiento del cáncer humano (Zachary and McGavin, 2013).

2.3. Cáncer en equinos:

La prevalencia de tumores en la especie equina es relativamente baja, se estima que es del 1-3% de todas las patologías en los equinos, muy por debajo de la incidencia en humanos y otras especies de animales domésticos (Andersson et al., 2008). Se desconoce la razón de esta aparente resistencia del equino a desarrollar procesos neoplásicos, aunque se están estudiando múltiples teorías genéticas. En la actualidad se están diagnosticando un mayor número de equinos con cáncer, probablemente la razón se debe a que los equinos están alcanzando un mayor tiempo de vida lo que permite que se desarrollen procesos oncológicos con mayor frecuencia, también debido a los cambios sociológicos que han conducido a considerar a los equinos como algo más que solo un animal de trabajo. Aunque tampoco se puede descartar que este aumento de la incidencia se relacione con una mayor capacidad de diagnóstico, al aplicar a la medicina equina técnicas diagnósticas que parecían limitadas a pequeños animales o incluso el ser humano, por ejemplo los estudios citológicos, diagnóstico avanzado por imagen, etc. (Davis and Rush, 2013).

Hay estudios que demuestran que el 80% de los tumores en equinos se presentan en la piel y tejidos subcutáneos. Aunque hay una alta incidencia de tumores malignos, la agresividad de los mismos suele observarse a nivel local, mientras que el porcentaje de tumores que manifiestan capacidad metastásica es muy limitado, generalmente inferior al 25% de los casos; aunque se han descrito numerosos tipos histológicos como: carcinomas de células basales, carcinoma de glándulas sudoríparas, diferentes sarcomas de tejidos blandos, los tres tumores más frecuentes son los sarcoides, carcinomas de células escamosas y melanomas. Con una incidencia significativa, pero mucho menos común, se encuentran otros tumores como el mastocitoma, el hemangiosarcoma o el linfoma cutáneo (Martínez de Merlo, 2012), (Scott and Miller, 2003), (Schaffer et al., 2013).

En un estudio acerca de datos examinados de neoplasias cutáneas y mucocutaneas en equinos, enviados al laboratorio de diagnóstico veterinario de la universidad del Estado de Oregón, en un periodo de 3.5 años, ellos reportaron que se presentaron un total de 536 neoplasias. De estas neoplasias las más comunes que encontraron fueron los sarcoides, carcinoma de células escamosas, tumores melanocíticos, papilomas y tumores de los mastocitos o células cebadas estas constituyendo el 87.5% de todas las neoplasias cutáneas. Los sarcoides representan el 51.4% de todas las neoplasias y del 15-18% de todas las accesiones de equinos. Los sarcoides fueron más comunes encontrarlos en las razas Paints, Cuarto de Milla, y Árabes y fue el único tumor encontrado en burros y mulas. El promedio de edad de los equinos que presentaron los sarcoides fue de 9 años de edad. El carcinoma de células escamosas constituye el 18.3% de todas las neoplasias y un 5.41% de todas las accesiones de equinos. El carcinoma de células escamosas oculares fue más común en las razas Paints y Cuarto de Milla y el carcinoma de células escamosas ya sea Prepucial/Peneana fue más común en las razas Appaloosas y Cuarto de Milla. El promedio de edad de los equinos con carcinoma de células escamosas fue de 13 años de edad y el cual fue significativamente menor que en aquellos equinos con carcinoma celular en el pene y prepucio con 21 años de edad y el carcinoma celular en región vulvar, anal y perianal, de los equinos con 19 años de edad. Los resultados sugieren que el Sarcoide equino y Carcinoma de células escamosas ocurren más frecuentemente en el noroeste del pacifico comparado con el noreste de los Estados Unidos. Las neoplasias más comunes, en orden decreciente de frecuencia encontradas en este artículo fueron los sarcoides, carcinoma de células escamosas, melanoma del equino tordillo, papiloma, nevus melanocítico (melanocitoma) y tumor de los mastocitos o células cebadas (Valentine, 2006).

2. 4. Melanoma en equinos:

El melanoma es un tipo de cáncer que se desarrolla en las células productoras de melanina de la piel (melanocitos). Los melanomas pueden ser duros o suaves y pueden encontrarse solitarios o mezclados con múltiples grupos de masas tumorales en ciertas áreas de los equinos. Normalmente son subcutáneos y no son visibles porque pueden estar cubiertos por piel normal con pelo; de cualquier modo, estos pueden ulcerarse e infectarse. Típicamente estos son de color gris oscuro a negros aunque algunos pueden no tener color. El diagnóstico de los que no tienen pigmento (amelanocíticos) requiere examinación al microscopio de muestras de biopsias. Los melanomas equinos son diferenciados únicamente como benignos o malignos, éstos no se clasifican dentro de estados como en el caso de melanomas en humanos. Por lo general son sólo localmente invasivos y de crecimiento lento. Son nódulos negros y se encuentran comúnmente debajo de la cola y alrededor de la vulva o el recto, cerca de la base de las orejas, alrededor del cuello y yugular así como alrededor de los ojos. Aunque estos tumores son generalmente suaves y no son dolorosos, si los melanomas empiezan a causar metástasis, podrían producirse consecuencias devastadoras. Por ejemplo, nódulos cancerosos que se desarrollan en el sistema interno del cuerpo del equino, en el abdomen o en el pecho podrían añadir presión y potencialmente inhibir la función de los órganos vitales (Burden 2011).

También se tiene reportado el caso de un caballo con presencia de metástasis intramedular diseminada de melanoma, el cual es un semental Warmblood de color gris de 12 años de edad que presento fiebre de origen desconocido y anemia. Cinco días más tarde desarrollo ataxia y postración y fue eutanaciado. En la necropsia, se identificaron melanomas malignos en el tejido subcutáneo perineal, bazo y el canal vertebral torácico en las vértebras (T10-T11). Ellos demuestran que los grupos de células de melanoma maligno se dispersaron por las cavidades medulares del esqueleto axial y apendicular y se identificaron

áreas completas a irregulares desde un color negro a una decoloración gris, este es el primer informe de melanoma intramedular diseminado en una especie doméstica (Patterson-Kane et al., 2001).

El melanoma cutáneo o mucocutáneo es el segundo a tercer tumor más frecuente descrito de la piel del equino representando el 18% de todas las neoplasias cutáneas (Bolin, 1999), (Valentine, 2006), (Fleury et al., 2013).

Este tipo de tumor es el más reportado en los caballos tordillos estimándose un 70-80% en los caballos mayores de 15 años de edad, los cuales además muestran una alta incidencia de lesiones de tipo vitíligo, otros tipos de colores en caballos también lo pueden desarrollar aunque es raro (Bellone, 2010), (Sutton and Coleman, 1997), (Fleury et al., 2013), (Seltenhammer et al., 2003).

Las patologías equinas dermatológicas son comúnmente tratadas como los mencionan estos autores por medio de cirugía (Barrie et al., 2008), crioterapia (Hewes and Sullins, 2006), radiofrecuencia, quimioterapia (Barabas et al., 2008; Hunter et al., 2007), (Laus et al., 2010) y/o electro quimioterapia (Scacco et al., 2013), (Theon et al., 2002), (Cauley et al., 2002).

Hay reportes que mencionan que se pueden tratar por medio de estimulación inmunológica con IL-12 aplicándola intratumoral en los melanomas, Ellos encontraron que con la inyección de ADN de plásmido que codifica la citocina interleucina 12 humana, en metástasis ya establecidas, se puede inducir la regresión significativa de la masa tumoral. Por ejemplo en un estudio que realizaron encontraron que todas las 12 lesiones tratadas, en un total de 7 equinos que ellos estudiaron se pudieron reducir. La desaparición completa la observaron sólo en una lesión tratada, sin recurrencia después de los 6 meses. Ellos reportan que no hay reacciones adversas en ninguno de los animales durante y después del tratamiento. Estos resultados demostraron la efectividad y la seguridad de la interleucina 12 en

la terapia de ADN de plásmido contra la enfermedad metastásica en melanomas (Heinzerling et al., 2000), (Pavlin et al., 2012), (Finocchiario et al., 2009).

Hay un reporte acerca del tratamiento de melanomas equinos con metástasis, con el uso de una vacuna de ADN de plásmido que codifica una proteína de *Streptococcus Pyogenes* EMM55. Ellos muestran el caso un caballo de la raza Cuarto de Milla con Árabe de 19 años de edad, macho castrado, que se presentó con una extensa historia de melanoma metastásico cutáneo. Ese estudio se realizó durante un período de 8 meses, con un total de 8 dosis de la vacuna de ADN de plásmido que expresa el gen de *Streptococcus Pyogenes* EMM55 (PAC/EMM55) estas fueron administradas por vía intratumoral, con una dosis de 300mg por medio de una aguja. Al finalizar el protocolo de vacunación, el tamaño de las lesiones inyectadas, en promedio, se redujeron un 40.3%. Las lesiones que no fueron inyectadas se redujeron en 47.6%. La reducción en promedio fue de 42.3%. La regresión del tumor también la asociaron con el aumento de la respuesta de anticuerpos antimelanoma IgG, lo que implica que una inducción de una respuesta antimelanoma eficaz sería de gran ventaja en el tratamiento del melanoma en equinos (Brown et al., 2014).

Hay otro estudio en el que se desarrollaron ensayos inmunológicos para medir la respuesta de los equinos vacunados con plásmidos de ADN exogénicos que codifican para la tirosinasa humana. La sobreexpresión de la tirosinasa se ha observado en los tumores melanocíticos equinos, apoyando su papel como un antígeno tumoral en el equino. Ellos demuestran que todos los equinos desarrollaron respuestas inmunes humorales y mediadas por células significativamente positivas en comparación con sus valores previos a la vacunación. No se detectaron reacciones adversas ni signos de autoinmunidad. También mencionan que esta técnica debe ser realizada en equinos con melanomas para

comprobar que funciona igual que en humanos y perros (Lembcke et al., 2012),(Li et al., 2014).

Todas estas técnicas funcionan bien sin embargo los tumores con el tiempo vuelven a crecer de tamaño, para mejorar este problema se necesitan desarrollar mejores tratamientos de terapia génica, para esto se tienen que identificar y caracterizar diferentes genes que se encuentran en los tumores de los equinos y estos puedan ser utilizados como biomarcadores para este tipo de neoplasia y futuros blancos terapéuticos.

2.4.1. Genes y proteínas relacionadas con los melanomas analizados en equinos:

Hay un estudio que identificó una mutación causante de la aparición del color gris en los equinos que se relaciona con la edad, esta se constituye de una duplicación intrónica de 4.6kb en el gen syntaxin 17 (STX17). La mutación se encuentra en un haplotipo de 352kb mostrando un completo desequilibrio del ligamiento (LD) en el fenotipo del color gris en ocho razas. Estos reportaron que se encontró poca evidencia para la expansión del número de copias de la secuencia duplicada en el ADN de sangre de equinos grises y por el contrario, se encontró una clara evidencia para la copia de expansiones numéricas en los tejidos de melanoma en cinco de las ocho muestras o líneas celulares de melanoma que ellos analizaron. También se encontró una tendencia de un mayor número de copias en tumores agresivos. La secuenciación masiva en paralelo de fragmentos de ADN de los 350kb del haplotipo Gris no reveló mutaciones adicionales asociadas con el fenotipo, lo que confirma la duplicación como la verdadera mutación causal. Ellos identificaron tres alelos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que estaban presentes en un subconjunto del haplotipo Gris, dentro de la región de 350kb que muestra un completo desequilibrio del ligamiento con la mutación causal. Por lo tanto, estas

tres sustituciones de nucleótidos, se han producido con posterioridad a la duplicación, esto concuerda con la interpretación de ellos, que la mutación Gris surgió hace más de 2.000 años antes del presente (Andersson et al., 2008), (Sundstrom et al., 2012), (Bellone, 2010), (Kavar et al., 2012).

Otro estudio demuestra que una duplicación de 4.6kb en el gen STX17 muestra que el fenotipo Gris en los equinos contiene elementos reguladores con efectos específicos de melanocitos. Además, los datos que ellos encontraron sugieren que la duplicación de esta secuencia transforma un promotor débil a un fuerte potenciador de melanocitos específicos. Por último, la identificación de los dos factores de transcripción asociados a sitios de unión del gen microftalmia (MITF) y la identificación de su significancia funcional, proporcionan una explicación posible para los efectos de los melanocitos específicos del alelo Gris, incluyendo el encanecimiento, la susceptibilidad de melanoma y el vitíligo (Sundstrom et al., 2012).

También se encontró en otro estudio para poder entender su herencia, el cual analizó el grado de melanoma, nivel de color gris, grado de vitíligo y grado moteado de 1,119 equinos de color gris en seis países durante un período de 9 años. Se estimó la heredabilidad y se dividió este parámetro en heredabilidad poligénica, heredabilidad debido a la mutación STX17 y heredabilidad del color gris debido al locus agouti (ASIP). Una alta heredabilidad se encontró para el encanecimiento, vitíligo y moteado, mientras que una heredabilidad moderada se estimó para el melanoma. El componente aditivo de ASIP fue significativamente diferente de cero sólo para el melanoma. El gen STX17 controla una gran proporción de la varianza fenotípica y heredabilidad total para todos los rasgos. Las correlaciones genéticas entre rasgos se estimaron como moderado a alto, debido principalmente a los efectos del locus STX17. Sin embargo, la correlación entre el envejecimiento progresivo y el vitíligo como despigmentación quedó grande o alto, incluso después

de tener en cuenta los efectos de STX17. Ellos presentaron un modelo en cuatro rasgos con los patrones de herencia, complejos que están fuertemente influenciados por una sola mutación. Esto lo relacionaron con la evidencia de estudios recientes en animales domésticos que indican que algunos rasgos complejos, además del gran número de genes con efectos aditivos pequeños, son influenciados por los genes de efecto moderado a grande. Además, ellos han demostrado que la mutación STX17 explica en gran medida la moderada a altas correlaciones genéticas entre rasgos, proporcionando un ejemplo de fuertes efectos pleiotrópicos causados por un solo gen (Curik et al., 2013).

Este gen se ha analizado en el humano, sin embargo, los polimorfismos en el gen STX17 no están asociados con el melanoma maligno cutáneo humano (Zhen-Zhen, Duffy et al., 2009).

Se ha analizado la activación constitutiva de la vía de señal extracelular regulada por quinasas (ERK) en el melanoma y melanocitos de la piel en equinos de color gris, demostrándose que la duplicación de 4.6Kb en el gen STX17 en equinos de color gris es una nueva mutación asociada a la activación constitutiva de la vía ERK en células melanocíticas y en donde el mayor número de copias de la mutación en el gen Gris se encontró en melanomas agresivos de equinos grises, lo que sugiere que la secuencia duplicada puede constituir un elemento de accionamiento del melanoma. Existen otros estudios en marcha para proporcionar evidencia de la relación mecanicista directa de la duplicación STX17 a la activación de la vía ERK y el desarrollo del melanoma y se ha evidenciado que los activadores somáticos como BRAF, RAS, GNAQ, GNA11 y KIT mutados, se observan con frecuencia en los melanomas de los humanos y estos no son necesarios para el desarrollo del melanoma en los caballos grises. La activación constitutiva de ERK en el melanoma del equino gris se fortalece como un modelo en contraparte con el humano. Donde las mutaciones en humanos con similar efecto con las mutaciones en el gen Gris,

pueden contribuir al desarrollo de melanoma en particular en los casos que carecen de mutaciones oncogénicas somáticas comunes (Lin et al., 2014).

Se ha evaluado y caracterizado la expresión de marcadores en melanomas en humanos que puedan ser aplicados en el diagnóstico de esta neoplasia en equinos por medio de la técnica de inmunohistopatología revelándose que los melanomas benignos de los equinos grises comparten características comunes con el nevus azul humano y con melanomas malignos desmoplásicos humanos. Se enfatiza que el gen S-100, el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), HMB-45, Ki-67, T-311 y CD44 pueden servir como marcadores fiables para los melanomas equinos. Sin embargo, se recomienda llevar a cabo más investigaciones para encontrar los factores que retardan la metástasis en los equinos grises, ya que pueden contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para el melanoma maligno en el humano (Seltenhammer et al., 2004).

Describiendo estas proteínas tenemos que:

La proteína S-100 está presente normalmente en las células derivadas de la cresta neural (células de Schwann y melanocitos), condrocitos, adipocitos, células mioepiteliales, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, y queratinocitos. Esta puede estar presente en algunas células epiteliales de mama. Está implicada en una variedad de funciones intracelulares y extracelulares. Las proteínas S100 están implicadas en la regulación de la fosforilación de proteínas, factores de transcripción, Ca^{2+} homeostasis, la dinámica de los componentes del citoesqueleto, las actividades enzimáticas, el crecimiento, la diferenciación celular, y la respuesta inflamatoria (Marenholz et al., 2004).

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular, ésta favorece la síntesis de ADN ya que es un cofactor de la ADN polimerasa delta.

Cuando existen daños en el ADN, la proteína PCNA se reubica y participa en la vía de reparación del ADN dependiente de RAD6 (Moldovan et al., 2007).

El HMB-45 (Melanoma humano negro 45) es un anticuerpo monoclonal que reacciona contra un antígeno presente en los tumores melanocíticos tales como los melanomas. Se utiliza en patología anatómica humana como un marcador para estos tumores. El antígeno específico reconocido por HMB-45 es Pmel 17 (Premelanosome protein) (Vogel et al., 1986).

El Antígeno KI-67 es una proteína nuclear y puede ser necesaria para la proliferación celular, además, se asocia con la transcripción de ARN ribosomal (Bullwinkel et al., 2006). La inactivación del antígeno Ki-67 conduce a la inhibición de la síntesis de ARN ribosomal (Rahmanzadeh et al., 2007).

La Tirosinasa es una enzima clave en la biosíntesis de la melanina y representa un marcador de diferenciación melanocítica. Existe un anticuerpo monoclonal murino para la proteína recombinante de la tirosinasa denominado T311, el cual ha sido probado para diagnóstico por inmunohistoquímica, probándose en un grupo de tejidos normales y neoplásicos y evaluando su sensibilidad en un gran número de metástasis y melanomas malignos primarios, nevos, tres angiomiolipomas y dos muestras de vitíligo, donde se demostró que el T311 reveló intensa reactividad en el material incluido en parafina la cual se limita a las células de diferenciación melanocítica concluyéndose así, que el T311 es un marcador específico y sensible para la detección de lesiones melanocíticas en los tejidos embebidos en parafina fijados con formalina y es un reactivo serológico útil para diagnóstico de esta patología (Clarkson et al., 2001).

CD44 es una glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular. También juega un papel

importante en la recirculación de linfocitos, facilitando la entrada de estos dentro del tejido linfoide y en la activación de células T (Spring et al., 1988).

De acuerdo a estudios previos, se ha concluido que a diferencia de otras especies, el establecimiento de cultivos primarios de melanoma en equinos podrían utilizarse para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos siendo esto un importante desafío. Se han realizado diferentes estudios para analizar células de melanoma equino y estas han mostrado que las líneas celulares de melanoma primario y metastásico expresan algunos marcadores como TYR, TRP1, MITF, PMEL, ASIP, MC1R, POMC, y KIT. Se ha encontrado expresión del gen supresor tumoral p53 en ambas líneas celulares, mientras que el p16 y PTEN fueron ausentes en la línea celular metastásica (Seltenhammer et al., 2014).

La clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS) y el Western Blot, han mostrado la expresión de marcadores asociados al melanoma como: Melan-A, MAGE-1, MAGE-3 y PCNA el cual es un antígeno nuclear de proliferación celular que se encuentra sobreexpresado en melanomas de rápida proliferación (Kamau Chapman et al., 2009). A pesar de que se ha encontrado la expresión de éstos marcadores, no se ha estudiado la función biológica de los mismos, en los equinos, sin embargo, en humanos si han sido caracterizados y podrían dar una idea del rol que están desempeñando en el melanoma de los equinos.

La proteína Melan-A es una proteína que se encuentra en los melanocitos normales de la piel y la retina y en la mayoría de los melanomas. Se está investigando como estrategia de terapia el uso de vacunas que emplean partes de la proteína Melan-A, debido a su capacidad de estimular la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas de los pacientes con melanoma. A esta proteína también se le conoce como antígeno de melanoma reconocido por células T1 y antígeno MART-1. Es de interés para los médicos como un potencial inmunoterapéutico y puede ser considerado como un nuevo marcador de

diagnóstico. Existen dos anticuerpos (A103 y M2-7C10) disponibles para estudiar la expresión de Melan-A/MART-1, ambos son de valor diagnóstico para el reconocimiento de tumores perivasculares de células epitelioides, como: angiomiolipoma, la linfangioleiomiomatosis y el tumor de células claras. El anticuerpo A103 tiene la propiedad de teñir muchas células productoras de hormonas esteroideas y es útil para el reconocimiento de tumores derivados de estas células, como los carcinomas de la corteza suprarrenal (Busam & Jungbluth, 1999) (Busam, y otros, 1998).

El antígeno asociado al melanoma 1 es una proteína que en los humanos está codificada por el gen MAGEA1. Este gen es un miembro de la familia de genes MAGEA. Los miembros de esta familia codifican proteínas con 50 a 80% de identidad de secuencia entre sí. Los promotores y los primeros exones de los genes MAGEA muestran una considerable variabilidad, lo que sugiere que la existencia de esta familia de genes permita la misma función que se expresa bajo diferentes controles transcripcionales. Los genes se agrupan en MAGEA y tienen localización cromosómica Xq28 y se han sido implicados en algunos trastornos hereditarios, tales como: la disqueratosis congénita humana (Bruggen et al., 1992).

La función normal de MAGE-A3 en las células sanas se desconoce hasta el momento. La presencia del antígeno en las células tumorales se ha asociado con un mal pronóstico. Los niveles altos de MAGE-A3 en adenocarcinoma de pulmón se han asociado con una baja supervivencia (Gure et al., 2005). MAGE-A3 es una proteína específica tumoral y se ha identificado en melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, neoplasias malignas hematológicas (Comms, 2012).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) actúa como un factor procesivo de ADN polimerasa δ en células eucariotas y es esencial para la replicación. El PCNA es un homotrímero y logra su procesividad rodeando el ADN, donde actúa como un andamio para reclutar proteínas implicadas en la replicación y

reparación del ADN, remodelación de la cromatina y la epigenética (Moldovan et al., 2007).

2. 5. Melanoma en Humanos:

El melanoma es la transformación maligna de los melanocitos. Es un tumor con gran capacidad de invasión y con frecuencia, puede producir la muerte del paciente. Representa sólo el 4% de todos los tumores malignos de la piel, pero es responsable, aproximadamente del 80% de las muertes por cáncer de la piel. En sus estadios tempranos es una enfermedad curable. En el año 2000, la incidencia total de melanoma a nivel mundial fue de 2,4 por 1000.000 hombres y de 2,21 por 100.000 en mujeres. La edad promedio de una persona con diagnóstico de melanoma es de 45 años. El melanoma es muy raro en la infancia o en la adolescencia; aun así la incidencia de estos casos ha aumentado en las últimas décadas. Los factores de riesgo para la especie humana incluyen factores del individuo, genéticos y ambientales (Acosta et al., 2009), (Crowson et al., 1999), (Kane, 2006), (Phillips, 2015).

Se conoce que en condiciones normales, la homeostasis determina si una célula permanece quiescente, prolifera, se diferencia, o sufre apoptosis. En este estado de homeostasis, los queratinocitos controlan el crecimiento de los melanocitos y el comportamiento a través de un complejo sistema de factores de crecimiento paracrino y moléculas de adhesión célula-célula. La alteración de este delicado equilibrio homeostático puede conducir a alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión célula-célula y célula de comunicación para el desarrollo de melanoma. Las células del melanoma se escapan de este control por los queratinocitos a través de tres mecanismos principales: (1) la baja regulación de los receptores importantes para la comunicación con los queratinocitos como E-cadherina, P-cadherina, desmogleína y conexinas, que se logra a través de factores

de crecimiento producidos por los fibroblastos o queratinocitos; (2) la regulación positiva de los receptores y moléculas de señalización que no se encuentran en los melanocitos pero que son importantes para la interacción melanoma-melanoma y las interacciones melanoma-fibroblastos tales como: N-cadherina, Mel-CAM y proteína-1 de zonula occludens (ZO-1); (3) pérdida de anclaje a la membrana de la base debido a una expresión alterada de la matriz extracelular de unión de la familia de las integrinas (Hass et al., 2005).

2.5.1. Genes involucrados en el melanoma humano:

El riesgo individual para el desarrollo de este tumor está determinado por la presencia de mutaciones heredadas o polimorfismos en los genes asociados al melanoma y por la magnitud de la exposición solar, aguda o crónica recibida a lo largo de la vida. Los principales genes reconocidos en el melanoma son el CDKN2A y el CDK4, involucrados en el control del ciclo celular. Los polimorfismos en el receptor MC1R, son clave en la formación de melanina en respuesta a la radiación ultravioleta, también están asociados con el incremento en el riesgo de melanoma. Se han encontrado mutaciones en PTEN, un gen involucrado en la inducción de proteínas supresoras del ciclo celular y de la apoptosis, en 30% a 60% de los melanomas no familiares. En la proliferación y transformación maligna de los melanocitos se han involucrado mutaciones activadoras de los oncogenes N-RAS y BRAF, que inducen la activación no controlada de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas) que conllevan a la proliferación y senescencia celular. Las mutaciones N-Ras se han detectado en un 15-20% de los pacientes con melanoma. La mutación del gen BRAF se encuentra presente en el 50% de todos los melanomas y hasta un 80% de los melanomas no inducidos por daño solar. Las mutaciones en el CDKN2A han sido uno de los eventos más estudiados en la patogénesis del melanoma. Este gen codifica dos proteínas que son fundamentales

en la regulación del ciclo celular y la transición de la fase G1-S, p16INK4A y p14ARF. La proteína P16 actúa como reguladora en la vía del retinoblastoma, al inhibir la cinasa dependiente de la ciclina 4 (CDK4). La CDK4 se une con la ciclina D para fosforilar la proteína del retinoblastoma, lo cual permite la liberación del factor de transcripción E2F y así, la progresión a la fase S del ciclo celular con la posterior división y proliferación celular. Una alteración en P16 permitiría la progresión no controlada del ciclo celular y la proliferación de células con daño del ADN. La p14ARF se une al MDM2 y regula el crecimiento de los melanocitos, inhibiendo la destrucción de p53. El MDM2 actúa en la degradación de P53, produciendo un aumento en la supervivencia de las células alteradas. Otro factor involucrado en el desarrollo del melanoma está asociado con la disminución de la diferenciación y la expresión de marcadores de melanoma regulados por el factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF). Este factor es el gen encargado del desarrollo y la diferenciación de los melanocitos, contribuye a la supervivencia de los melanocitos mediante el incremento en la expresión de los factores antiapoptóticos BCL2 y BclxL. En el melanoma, una reducción en la proteína BCL2 causa muerte celular; al parecer, la supervivencia del melanoma se debe a dicha proteína. La expresión del MITF es regulada por la α -MSH y su acción sobre el receptor MC1R; dicha interacción incrementa la transcripción de genes relacionados con la síntesis de melanina, como son la tirosinasa, la proteína relacionada con la tirosinasa 1 y la dopacromotautomerasa. El MITF también regula la transcripción de genes homólogos de plata específicos para melanocitos (melanocyte-specific genes silver homologue, SILV) y Melan-A (MLANA), los cuales pueden detectarse por técnicas de inmunohistoquímica como apoyo para el diagnóstico de melanoma. La disminución o ausencia de la expresión de SILV y MLANA acompañan la progresión de nevus a melanoma y además, empeoran el pronóstico. La amplificación del MITF ocurre con mayor frecuencia en tumores con pobre pronóstico y se asocia a resistencia a la quimioterapia (Acosta et al., 2009).

2.6. El gen del Tumor de Wilms (WT1):

2. 6.1. WT1 y embriogénesis:

Se ha encontrado que en la etapa embrionaria WT1 desempeña un papel esencial para el desarrollo de diversos órganos del tracto genitourinario, bazo y estructuras mesoteliales (Schamhost et al., 2001).

En el tejido normal del adulto, éste se expresa en el mesotelio, células de podocitos glomerulares y mesangiales del riñón, células madre CD34-positivas hematopoyéticas, células de Sertoli de los testículos, células de la superficie del epitelio y granulosa del ovario, células del miometrio y estroma endometrial del útero. También está presente en tumorigenesis (Shin-ichi et al., 2006), (Muñoz-Chapuli et al., 2003).

2.6.2. Estructura del Gen WT1:

El gen WT1 se localiza en los humanos en el cromosoma 11p13 y abarca aproximadamente 50kb e incluye 10 exones, que generan un ARNm de 3kb, con dos splicing alternativos, tiene 4 dedos de zinc en la porción carboxilo terminal del dominio de unión al ADN y también involucra interacciones con ARN y proteínas y comparte homología con la familia del gen EGR (Early Growth Response) responsable del crecimiento temprano lo que sugiere un papel de la proteína WT1 como un factor de transcripción (Shin-ichi et al., 2006).

El dominio N-terminal de WT1 está compuesto de secuencias ricas en prolina-glutamina y está involucrado en interacciones de ARN y proteínas, este dominio es crítico para la función de regulación transcripcional ya que contiene dominios de represión y activación génica. El dominio C-terminal está formado por 4 dedos de zinc del tipo Kruppel Cisteína²-Histidina², que representan su dominio de unión a ADN y también está involucrado en interacciones ARN y proteína. Una de las

características clave para entender las múltiples funciones de la proteína WT1, es la existencia de diversas isoformas causadas fundamentalmente por la presencia en el gen de dos regiones de corte y empalme de exones (splicing) alternativo, una región que codifica para 17 aminoácidos en el exón 5, de 51pb y una pequeña secuencia de tres aminoácidos situada entre los dedos de zinc tres y cuatro, entre los exones 9 y 10, denominados KTS (lisina-treonina-serina). Por las combinaciones entre las dos zonas de corte y empalme de exones (splicing) alternativo se generan cuatro isoformas fundamentales. Otras modificaciones menores provocadas por la edición del ARNm y por la presencia de 3 sitios alternativos de iniciación de la traducción (CTG en la posición -68 que genera una isoforma de 60-62kD, ATG en la posición 0 que genera una isoforma de 52-54kD y ATG en la posición 127 que genera una isoforma de 36-38kD) dan lugar 24 isoformas distintas en mamíferos. (Fig. 1) (Zamora-Avila et al., 2007).

Entre todas estas isoformas, la variable fundamental es la presencia o ausencia de la secuencia KTS, ya que las isoformas que carecen de ella muestran mucha mayor afinidad por el ADN. De hecho se ha comprobado mediante microscopia confocal que la propia localización celular de la proteína WT1 es diferente según se trate de una isoforma -KTS o +KTS. La primera se localiza fundamentalmente en el núcleo de forma difusa u ocupando amplios dominios. En cambio la isoforma WT1 (+KTS) se encuentra en pequeñas gotas situadas en el interior y alrededor del núcleo, esto se ha interpretado en términos de la organización de la isoforma WT1 (+KTS) en maquinaria de corte y empalme de exones (espliceosomas), complejos ribonucleoproteicos en los que se produce el corte y empalme de exones (splicing) o procesamiento del ARNm. En general la isoforma +KTS está asociada con procesos de maduración del ARNm, mientras la -KTS se asocia al proceso de transcripción (Zamora-Avila et al., 2007).

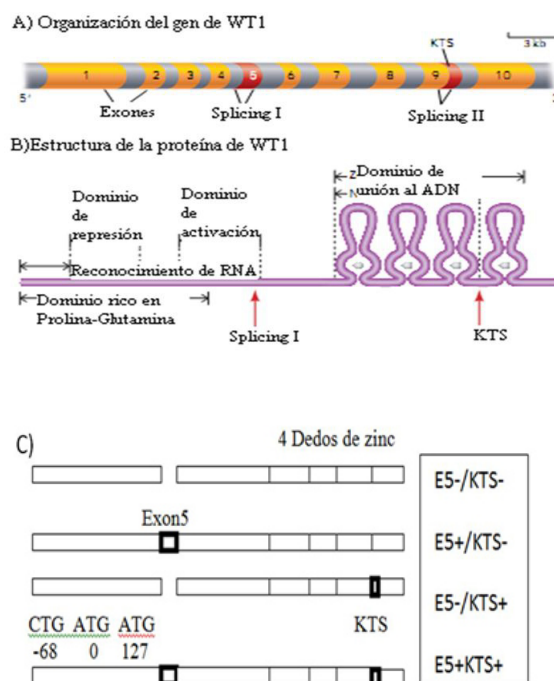


Figura 1. Estructura de WT1. A) Organización del gen WT1. Se muestran los 10 exones que conforman el RNAm y los dos sitios de splicing alternativos. B) Estructura de la proteína de WT1 donde se muestra el dominio de represión, activación, sitios de splicing y dominio de unión a ADN a través de cuatro dedos de zinc. C) Isoformas de WT1 como resultado de los splicing alternativos: E5-/KTS-, E5+/KTS-, E5-/KTS+, E5+/KTS+ de acuerdo a la presencia o ausencia de 17 AA en el exón 5, y de 3 AA (Lisina- Treonina- Serina) entre los dedos de zinc 3 y 4. También se muestran los 3 sitios de iniciación de la traducción que genera tres isoformas con diferente peso molecular: 60-62kD, 52-54kD, 36-38kD.

2.6.3. Secuencia del Gen WT1 en equinos:

Actualmente, existe una secuencia para WT1 de Equus Caballus reportada en el GenBank con número de acceso AH008865.2. Se encuentra en el locus SEG-AF201736S con un total de 524pb. Existe también una secuencia de predicción para WT1 de 2915pb bajo el número de acceso XM_005612334.1 PREDICTED: Equus Caballus Wilms tumor 1 (WT1), ARNm (Brouillette et al., 2000).

2.6.4. WT1 como oncogén:

Dentro de la gama de genes que se encuentran expresados de manera diferencial en células cancerosas, resalta la incidencia del gen supresor del tumor de Wilms. Se ha demostrado una alta expresión del gen WT1 en una gran variedad de neoplasias en humanos, desde leucemias y linfomas hasta tumores sólidos de mama, pulmón, ovario, útero, tiroides, melanoma, entre otros, lo cual hace suponer que desempeña un papel oncogénico relevante (Guy et al., 2000).

El Gen WT1 viene del nombre de Max Wilms (1867-1918), él fue un cirujano alemán que lo identificó por primera vez. WT1 fue descrito originalmente como un gen supresor tumoral basado en su inactivación mutacional, en un subconjunto de carcinoma renal pediátrico (nefroblastoma o tumor de Wilms). El gen fue identificado durante el estudio de las bases genéticas del tumor de Wilms. Esta forma de cáncer renal es una de las más frecuentes en pediatría; afecta a un niño de cada 10,000; es el tumor sólido intraabdominal más común en la infancia originado del blastema metanéfrico. El gen WT1 fue identificado por primera vez como un supresor tumoral que participa en el desarrollo del tumor de Wilms. El tumor de Wilms ocurre con una frecuencia elevada en pacientes con aniridia, criptorquidia, hipospadias del meato urinario y otros trastornos congénitos genitourinarios. El riesgo de desarrollar este tumor es también aumentado en niños con el síndrome de Beckwith Wiedemann, el síndrome de Denys-Drash, el síndrome de Bloom y el síndrome WAGR (Guy et al., 2000).

La mayoría de los nefroblastomas son unilaterales, siendo bilaterales en menos del 5% de los casos. Se ubican con más frecuencia en el polo superior del riñón, tienden a ser tumores encapsulados y vascularizados que no rebasan la línea media hacia el lado opuesto del abdomen. Cuando existe metástasis tiende a ser al pulmón. El tumor de Wilms es un tumor maligno que contiene blastema metanéfrico, epitelio y estroma. Es característica su presencia en los glomérulos y

túbulos renales rodeado por un estroma celular. El estroma puede incluir músculo estriado, cartílago, hueso, tejido graso y tejido fibroso. El tumor suele comprimir el parénquima renal normal. El componente mesenquimal puede incluir células que muestran diferenciación rabdomioide, el cual puede por sí mismo mostrar elementos de malignidad. El gen WT1 fue descubierto a partir de las evidencias de delección en el brazo corto del cromosoma 11 asociadas al síndrome de WAGR, una anomalía congénita caracterizada por aniridia, retraso mental, malformación genitourinaria y tumor de Wilms. Pronto se comprobó que alrededor de 10 a 15% de los tumores de Wilms presentaban mutaciones en el gen WT1 con pérdida de función en ambos alelos, por lo que se consideró como un supresor tumoral (Muñoz-Chapuli et al., 2003), (Shin-ichi et al., 2006).

El gen WT1 codifica para un factor de transcripción involucrado en proliferación, diferenciación y apoptosis mediante la supresión o activación génica, dependiendo del tipo de tumor, la proteína de WT1 puede funcionar como supresora de proteínas tumorales o factores de sobrevivencia tumoral. Otras funciones que puede desarrollar son regulando la transcripción de una variedad de genes blanco y pueden ser involucrados en procesamientos post transcripcionales de ARN. Este gen codifica al menos 24 isoformas diferentes (Shin-ichi et al., 2006).

Existe un estudio realizado en el que se encontró la expresión endotelial de WT1 detectándose en el 95% de 113 tumores de origen diferente. Para analizar la función de WT1 en las células endoteliales, se utilizó un enfoque de ARNi in vitro y ellos demostraron que la inhibición de WT1 reduce la proliferación celular, la migración y la formación de tubo endotelial. A un nivel molecular, el silenciamiento de la expresión de WT1 disminuye el factor de transcripción ETS-1. WT1 y ETS-1 comparten una expresión de solapamiento en el endotelio del tumor. Estos hallazgos que encontraron sugieren que la activación transcripcional de ETS-1 por el gen WT1 es un paso crucial en la vascularización del tumor a través de la regulación

de la proliferación de células endoteliales y la migración. La vascularización es un paso importante en la transición de un pequeño grupo de células malignas a un tumor macroscópico visible capaz de propagarse a otros órganos a través de la vasculatura. El programa genético que controla este proceso no se entiende completamente aunque se sabe que las células tumorales pueden inducir la angiogénesis (Schamhost et al., 2001), (Muñoz-Chapuli et al., 2003).

Existe un estudio en el cual la reducción en el suministro de oxígeno en el núcleo del tumor (hipoxia), resulta en la estabilización del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y la posterior activación de sus genes diana como WT1, lo ha postulado como un factor importante en este proceso incluyendo la angiogénesis, la supervivencia celular, metabolismo de la glucosa y la invasión (Semenza, 2003). En condiciones de suministro de oxígeno reducido, WT1 es activado por HIF-1 en las células vasculares y con esto se identificó a (WT1) como una molécula importante, que está regulada transcripcionalmente por HIF-1 (Wagner et al., 2003).

Una variedad de otras moléculas, por ejemplo, VEGF, VEGF-R2, angiopoyetinas, nestina y factores de transcripción ETS han sido implicadas en la angiogénesis tumoral, hay evidencia que WT1 activa al gen nestina, un marcador bien conocido de la angiogénesis en el desarrollo cardíaco y renal (Wagner et al., 2008).

2.6.5. Inmunohistoquímica de WT1:

En años recientes la inmunohistoquímica se ha convertido en una importante herramienta para el diagnóstico histopatológico. La técnica de inmunofluorescencia desarrollada por Albert Coons y colaboradores sentó las bases de la inmunohistoquímica actual. Para la adecuada interpretación de los inmunorreactantes, los patólogos deben de estar familiarizados con la localización

celular y subcelular de los anticuerpos. Hay antígenos celulares localizados en la membrana, el núcleo o el citoplasma así como antígenos extracelulares. Debido a la gran variedad de factores capaces de influir en la demostración de antígenos, pueden surgir diversos problemas técnicos y de interpretación. La fijación, el tipo, la duración, el pH del fijador, la temperatura, la sensibilidad de la clona utilizada, el sistema de detección y el cromógeno, entre otros, son esenciales para la adecuada inmunomarcación (Jorge-Buys et al., 2007).

La inmunodetección de WT1 en células tumorales ha sido un paso esencial en estudios de cáncer. Por medio de Inmunohistoquímica, WT1 es detectada en el núcleo de células del tumor de Wilms y mesotelioma; en consecuencia, la proteína WT1 tradicionalmente ha sido utilizada como un marcador diagnóstico de este tumor. Esta proteína WT1 no solo está involucrada en regulación transcripcional en el núcleo sino también en el metabolismo del ARN y regulación de la traducción en el citoplasma. Debido a que el gen WT1 ha sido identificado como una diana molecular para la inmunoterapia del cáncer, la detección inmunohistoquímica de WT1 en células tumorales se ha convertido en una parte esencial de la práctica de rutina. Existe un estudio en el cual la expresión de WT1 fue examinado en 494 casos de cáncer en humanos, incluyendo los tumores del sistema gastrointestinal y pancreatobiliar, tracto urinario, órganos genitales masculinos y femeninos, de mama, pulmón, cerebro, piel, tejidos blandos y hueso, mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo policlonal (C-19) y el monoclonal (6F-H2) contra la proteína WT1. La tinción para los anticuerpos C-19 y 6F-H2 la encontraron en el 35-100% y del 5-88% de los casos de cada tipo de tumor, respectivamente. Los tumores positivos a WT1 incluyen al tumor del estómago, próstata, biliar, urinario y melanomas malignos. En la mayoría de los casos positivos se mostró una tinción difusa o granular en el citoplasma, mientras que los tumores de ovario y tumor de células pequeñas redondas desmoplásicas mostraron tinción nuclear. Los glioblastomas, algunos de los sarcomas de tejidos blandos,

osteosarcomas y melanomas malignos de la piel mostraron una tinción citoplásmica fuerte en comparación con otros tumores. El análisis de transferencia de Western Blot mostró que la proteína WT1 se expresa predominantemente en el citoplasma de las células tumorales en dos casos de adenocarcinoma de pulmón. Ellos enfatizan que la detección inmunohistoquímica en secciones histológicas procesadas rutinariamente, podría proporcionar información significativa sobre la expresión de WT1 en células de cáncer (Shin-ichi et al., 2006).

La proteína WT1 ha sido expresada predominantemente dentro del citoplasma de células neoplásicas. La expresión de WT1 esta incrementada en estados avanzados en melanoma y con este estudio se llegó a la asociación de la expresión de la proteína de WT1 con un mal pronóstico en melanoma (Garrido-Ruiz et al., 2009).

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción activados por ligando que influyen fuertemente en la señalización molecular en las células normales y cancerosas. Las evidencias sugieren un papel de los PPAR en la carcinogénesis de la piel, sólo la expresión de PPAR γ ha sido investigada en los tejidos de melanoma humano. La activación de PPAR α ha demostrado que inhibe el potencial metastásico, mientras que la estimulación de PPAR γ disminuye la proliferación de células de melanoma. Ellos muestran que el tercer miembro de la familia PPAR, PPAR β/δ se expresa en muestras de melanoma humano. La activación farmacológica específica de PPAR β/δ inhibe la proliferación de células humanas y de melanoma murino. La inhibición de la proliferación se acompaña de disminución de la expresión del gen supresor de tumor de Wilms 1 (WT1), que está implicado en la proliferación del melanoma (Michiels et al., 2010).

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Diseño experimental:

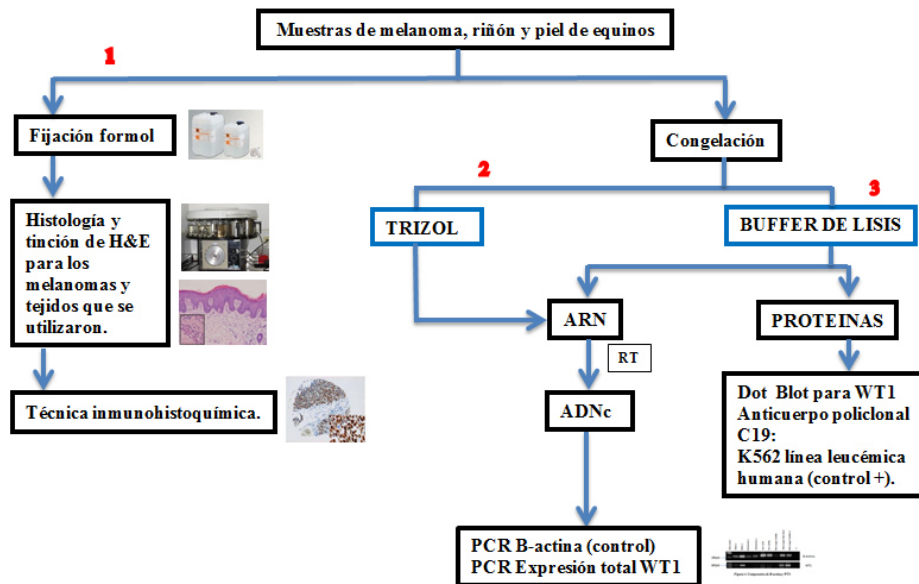


Figura 2. Diseño experimental.



Figura 3. Extracción de ADN de sangre.

3.2. Recolección de muestras:

Se obtuvieron 2 muestras de sangre completa (Blue Roan y Tordillo), 10 muestras de melanoma de equinos tordillos de las cuales 2 se extrajeron del cuello y las 8 restantes del maslo de la cola y región perianal de equinos que iban a ser sacrificados en los rastros de los municipios de Escobedo y el Carmen Nuevo León y posteriormente después del sacrificio se obtuvieron 2 muestras de riñón sano y 4 de piel sanas (Tordillo, Retinto, Moro y Alazán).

Para la obtención de las muestras de sangre completa, se realizó la asepsia, desinfectando con una torunda con alcohol el área de punción para evitar la contaminación de la muestra, ésta se obtuvo de la vena yugular de los equinos, se usó una aguja de calibre 18 con una longitud de 3cm y posteriormente se recolectó la sangre en tubos Vacutainer® (BD Franklin Lakes USA) con anticoagulantes K2 EDTA (Ácido Etelin-Diamino-Tetracético al 10%) de 7.2mg para 4ml, previamente rotulados.

Para la obtención de las muestras de melanomas, se desinfecto el área de punción con una torunda con alcohol, después se sedó a los equinos con 1.1mg/kg de Xilacina al 10% (Procin® Equus-PiSA Farmacéutica Agropecuaria, DF, México) y 0.01mg/kg de Detomidine (Domosedan®-Pfizer AG, Zurich, Switzer Land) a través de la vena yugular, posteriormente se rasuró y preparó asépticamente el área de recolección de la muestra, se aplicaron 10ml del anestésico local subcutáneo Lidocaína al 2% (Pisacaina®-PiSA Farmacéutica Agropecuaria, DF, México) en el perímetro del tumor y posteriormente fueron extirpados quirúrgicamente por medio de técnicas estándar, inmediatamente después de la extirpación, cada tumor fue dividido en dos piezas, una se colocó en formalina bufferada neutro al 10% en un frasco rotulado y fue llevada al Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y la otra se resguardo en una bolsa plástica rotulada, la cual se transportó en una caja de material aislante térmico con

refrigerantes al Departamento de Genética de la FMVZ, al igual que las muestras de riñón y piel sana.

3.3. Análisis histológico por tinción H&E:

Las muestras de melanomas, riñones y pieles sanas de los equinos fijados en formalina bufferada neutro al 10%, se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 4- μ m que posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), para analizar la morfología de cada tejido y corroborar el diagnóstico.

3.4. Extracción de ADN a partir de sangre:

3.4.1. Técnica de Wizard® Genomic DNA Purification Kit:

En dos tubos eppendorf de 1.5ml se colocaron 300 μ l de sangre de cada muestra, después se agregaron 900 μ l de solución de Lysis cell, se mezcló por inversión 6 veces y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos (aquí se invirtieron 3 veces para lisar las células), posteriormente se centrifugaron a 13000rpm por 20 segundos, enseguida se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet y se les agregó 300 μ l de solución Nuclear Lysis, seguido de una incubación 37°C por 1 hora, posteriormente se les adicionó 1.5 μ l de RNasa y se mezclaron 5 veces por inversión, enseguida se incubaron a 37°C por 15 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se les agregó 100 μ l de solución salina para precipitar la proteína y se les dio vortex por 20 segundos, posteriormente se centrifugaron a máxima velocidad por 3 minutos y se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf de 1.5 μ l, se les agregaron 300 μ l de Isopropanol y se centrifugaron a máxima velocidad por 1 minuto, se les adicionaron 300 μ l de Etanol al 70% y se centrifugaron a máxima velocidad por 1 minuto, posteriormente se decantaron los alcoholes dejándose secar a 37°C por 30 minutos, el ADN se rehidrató con 100 μ l de la solución

rehidratadora del Kit, se incubaron a 65°C por 1 hora y finalmente se corrieron en gel de agarosa al 0.8% para poder visualizar el ADN y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

3.5. Extracción de ARN a partir de tejido:

3.5.1. Técnica de Trizol (TRIzol ® Reagent, Life Technologies):

Se pesaron 100mg de tejido el cual se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido, se agregó 1ml de Trizol hasta que se uniformizó la mezcla y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, después se pasó a un tubo eppendorf de 2ml y posteriormente se adicionaron 200µl de cloroformo y se les dio vortex (agitación vigorosa) por 15 segundos, se incubó la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 5 minutos a 4°C.

Después de centrifugar la muestra, ésta se separó en 3 fases: una acuosa o superior la cual contiene el ARN, una interfase o fase media que contiene las proteínas y una fase inferior roja que corresponde a la fase orgánica que contiene el ADN. La fase acuosa o superior se colocó en un tubo nuevo y se adicionaron 500µl de Isopropanol, posteriormente se mezcló por inversión 10 veces, se centrifugó por 10 minutos a 4°C a 12000g, se decantó el Isopropanol y se le agregó 1ml de etanol al 80%, se le dio vortex por 3 segundos y se centrifugó a 12000g por 5 minutos, a 4°C. Posteriormente se decantó el etanol y se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el ARN con 20µl de H₂O DEPC y se incubó a 55°C por 10 minutos para posteriormente leer su concentración a 260nm. El ARN se almacenó a -70°C.

3.6. Síntesis del ADN complementario (ADNc):

Se adicionó en un tubo Eppendorf un volumen correspondiente a 5µg de ARN, 1µl de oligo desoxitimidina (oligo dT 0.5mg/µl) y 1µl de una mezcla de dNTPs 10mM y se llevó a un volumen de 12µl con agua DEPC, se calentó a 65°C por 5 minutos, después se adicionó 4µl de Buffer First Strand 5x, 2µl de Dithiothreitol (DTT) 0.1M y 1µl de Inhibidor de ribonucleasa, se mezcló y se incubaron las muestras a 42°C por 2 minutos; posteriormente se adiciono 1µl de Superscript RT (1U/µl) a cada muestra y se mezcló por pipeteo, se incubaron a 42°C por 50 minutos y se inactivo la reacción calentándola a 70°C por 15 minutos.

3.7. PCR del ADNc para β -actina y expresión total de WT1:

Para verificar la integridad del ADNc, se realizó un PCR para amplificar un fragmento de 215pb del gen de la B-actina utilizando los siguientes iniciadores: 5'-TAAGGACCTGTACGCCAACACAGT y 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT. Estos primers fueron diseñados con el software de libre acceso en la web Primer3. La amplificación se llevó a cabo con 35 ciclos, la temperatura de desnaturalización a 94°C por 60 segundos; el alineamiento de los primers a 60°C por 35 segundos y la extensión a 72°C por 40 segundos.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para analizar la expresión total de WT1 están diseñados para amplificar un fragmento de 800pb entre los exones 7 y 8: 5'-GAGAAACCATACCAAGTGTGA-3' y 3'-GTTTTACCTGTATGAGTCCT-5'. (Brouillette, Andrew, & Venta, 2000). La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos, la temperatura de desnaturalización a 94°C por 60 segundos; el alineamiento de los primers a 55°C por 120 segundos y la extensión a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR para β -actina y WT1 fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Todos los productos fueron visualizados utilizando Gelred_{TM} (Biotium) y/o bromuro de etidio bajo la luz UV de un transluminador (MultiDoc-IT, Digital Imaging System).

3.8. Extracción y cuantificación de proteínas:

Se pesaron 100mg de tejido el cual se pulverizo en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se resuspendieron las muestras en el mortero con 100 μ l de buffer de lisis (Tritón al 1%, 150mM NaCl, 25mM Tris pH7.6), se pasaron a tubos eppendorf y se incubaron en hielo por 1 hora, posteriormente se centrifugaron a 7500rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante de cada muestra a tubos eppendorf para su posterior almacenamiento en el congelador a -80.

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas por el método de Lowry con el kit DC Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. Se mezclaron 19 partes del reactivo A (1000 μ l) (solución de tartrato de cobre alcalino) con una parte del reactivo S (20 μ l) (Dodecil sulfato de sodio) para cada una de las muestras y de este mix se agregaron los 20 μ l a cada uno de los pozos de una caja de 96 pozos, posteriormente se agregaron 5 μ l de las proteínas en una dilución 1:5, finalmente se agregaron a cada pozo 175 μ l del reactivo B (reactivo Folin), se incubó la placa por 10 minutos a temperatura ambiente bajo la oscuridad y posteriormente se analizó la placa a 595nm en el espectrofotómetro. Las proteínas se almacenaron a -80°C.

3.9. DOT BLOT:

En el BIO-DOT® Microfiltratum Apparatus (cámara de absorción) se colocó una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se añadieron 150µg de proteínas de cada muestra en cada pozo de la cámara y se dejaron reposar por 5 minutos y posteriormente se aplicó vacío. Se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución bloqueadora compuesta de TBS-Tween (50 mMTris, 150 mMNaCl, 0.05% Tween 20), con leche descremada al 5% durante 1 hora. Para la detección de la proteína de WT1, la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal WT1-C19 (1:1000) (Santa Cruz Biotenhnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) y como control de carga con el anticuerpo monoclonal de β -actina (1:2500). Se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y se agregó el segundo anticuerpo (anti-conejo) en una dilución (1:10000) y (anti-ratón) en una dilución (1:5000), éstos se incubaron por 2 horas. Las proteínas se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia de acuerdo al protocolo Lumi-Light Western Blotting (Roche, Pleasanton, CA, USA).

3.10. Inmunohistoquímica y el Índice Binario de reactividad:

Inicialmente se realizó una despigmentación de las muestras de melanoma para lo cual los tejidos se desparafinaron en la plancha de calor o incubadora a 60°C por 10 minutos y se pre-hidrataron en xileno por 10 minutos, después se incubaron en el tren de etanol a diferentes grados (absoluto, 96°C, 70°C, 50°C) por 3 minutos, posteriormente se incubaron con Permanganato de Potasio (aclarador) por 30 minutos y enseguida se incubaron con Acido Oxálico por 5 minutos, se lavaron con agua destilada sumergidos por 10 minutos y posteriormente se sumergieron en PBS al 1x por 5 minutos y se realizó la técnica de inmunohistoquímica.

La expresión de la proteína de WT1 en los tejidos se determinó por inmunohistoquímica. Los cortes se realizaron en el microtomo con un espesor de 4µm y se colocaron en porta objetos o laminillas, enseguida se desparafinaron en la

plancha de calor o incubadora a 60°C por 10 minutos y se pre-hidrataron en xileno por 10 minutos, después se incubaron en el tren de etanol a diferentes grados (absoluto, 96°C, 70°C, 50°C) por 3 minutos, se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos, se incubaron en Buffer citrato pH-6 para la recuperación antigénica y se calentaron 20 segundos, posteriormente se enfriaron con 80ml de agua destilada y nuevamente se lavaron sumergidos en PBS al 1x por 5 minutos, se incubaron con Tritón X-100 (solución permeabilizante) por 8 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos y se incubaron con peróxido-metanol ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-CH}_3\text{OH}$) por 10 minutos a temperatura ambiente, nuevamente se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos y se incubaron con 25 a 50µl de la solución de bloqueo (BSA-Albumina Sérica Bovina) por 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos, se incubaron con el anticuerpo primario WT1 policlonal C19 1:50 (Santa Cruz Biotenhnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) toda la noche dentro de una cámara húmeda a 4°C, al día siguiente se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo 1:100 (Santa Cruz Biotenhnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) por 6 horas dentro de la cámara húmeda a 4°C, se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos y se incubaron con Diaminobencidina (DAB-solución reveladora de color café) mezclada con agua oxigenada al 3% para activarla (H_2O_2) por 20 segundos, posteriormente se contrastaron con Hematoxilina por 40 segundos y se lavaron con PBS al 1x sumergidos por 5 minutos, después se incubaron en el tren de etanol a diferentes grados (50°C, 70°C, 96°C, absoluto) por 3 minutos y se incubaron en xileno por 5 minutos para ser montadas con resina sintética (Entellan), se dejaron secar 24 horas y finalmente se observaron al microscopio.

3.10.1. Índice binario de reactividad (IBR):

Los IBR's se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IBR} = (\% \text{ de tinción}) (\text{Numero De células teñidas})$$

Otorgando los siguientes valores, ver Tabla I.

% de Tinción	Número de células teñidas
Nada = 0	Nada =0 (0 %)
Leve =1	Leve =1 (1 a 25 %)
Moderado =2	Moderado =2 (26 a 50 %)
Medio =3	Medio =3 (51 a 75 %)
Alto =4	Alto =4 (76 a 100%)

Tabla 1 Método de obtención de IBR

3.11. Análisis estadístico:

Se realizó una prueba de Chi cuadrada para analizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en las inmunohistoquímicas.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis histológico mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina de las muestras de melanoma y tejido normal de equinos:

4.1.1. Análisis histológico de melanomas:

Para corroborar el diagnóstico presuntivo de melanoma se realizó el análisis histológico de las 10 muestras de melanoma mediante la tinción con H&E. Se analizó la arquitectura de cada tejido y se observó la presencia de melanina que rodeaba totalmente a los vasos sanguíneos de diferente grosor (Fig. 4-A), así como vasos sanguíneos engrosados con presencia de focos de edema en la pared del capilar y alrededor de éste una gran cantidad de melanina invadiéndolo (Fig. 4-B), también se encontraron vasos sanguíneos colapsados por la gran abundancia de melanina a su alrededor ya sin dejar espacio libre (Fig. 4-C) y la presencia de gran infiltrado de melanina hacia la luz de los vasos sanguíneos (Fig. 4-D).

Se encontraron melanosomas de distintas formas y tamaños, rodeando e invadiendo por completo a los vasos sanguíneos ya sin espacio libre, éstos son característicos de malignidad (Fig. 5).

También se encontraron trombos de diferentes tamaños dentro de los vasos sanguíneos con presencia de melanofagos (Fig. 6). Se observó gran cantidad de infiltrado de melanina en las células de la dermis y también algo en la epidermis (Fig. 7). Se encontró melanina abundante alrededor e infiltrada en las fibras musculares (Fig. 8). Finalmente, se observó a las glándulas sebáceas rodeadas por abundante melanina y melanocitos empezando a infiltrar las mismas, así como focos de edema intersticial (Fig. 9).

Todas estas características son particulares de melanomas, lo cual confirmó el diagnóstico presuntivo.

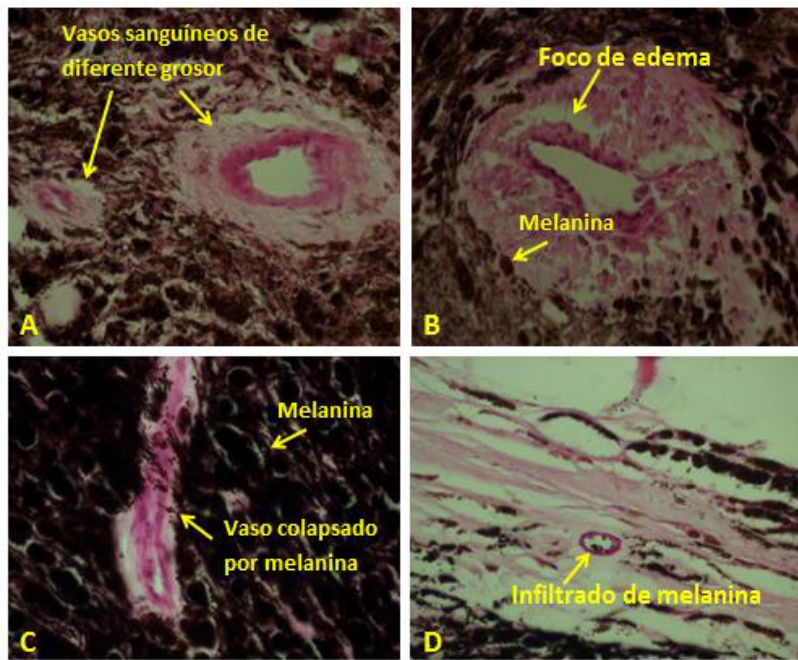


Figura 4. Hallazgos histológicos en melanomas. Vasos sanguíneos. A) Vasos de diferente grosor. B) Melanina y foco de edema. C) Melanina y vaso colapsado por la gran cantidad de melanina. D) Vaso sanguíneo con infiltrado de melanina mostrando posible metástasis.

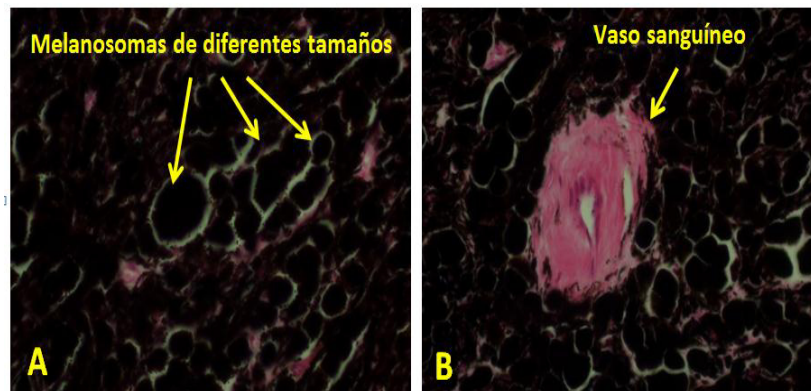


Figura 5. Hallazgos histológicos en melanomas Melanosomas. A) Melanosomas de diferentes tamaños. B) Vaso sanguíneo estrecho y rodeado de una gran cantidad de melanosomas de diferentes tamaños.

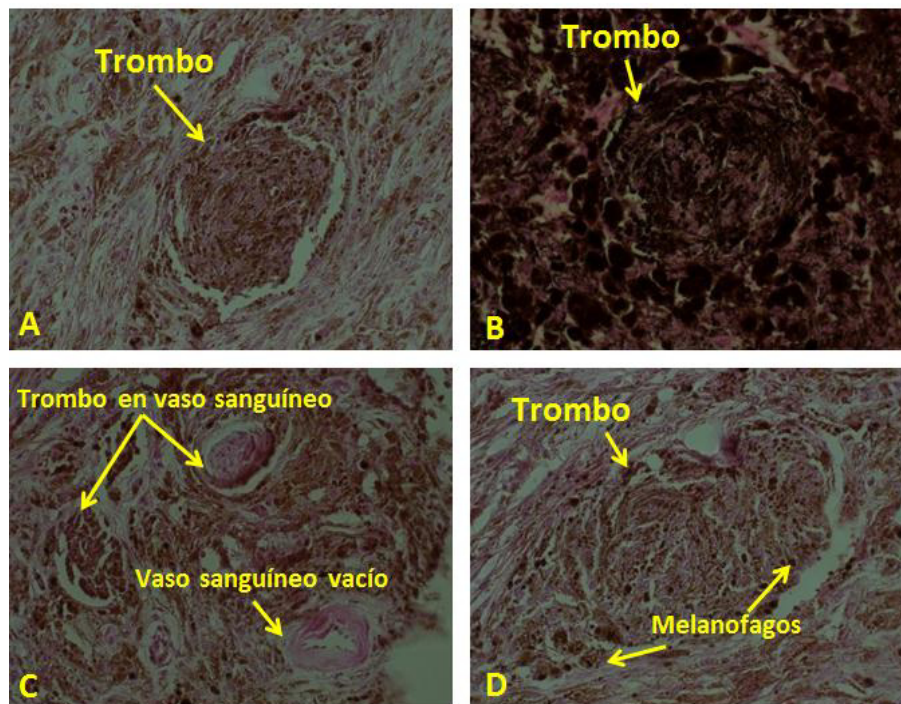


Figura 6. Hallazgos histológicos en melanomas Trombos: A) Trombo. B) Trombo con gran cantidad de melanosomas. C) Vaso sanguíneo vacío engrosado y trombos. D) Trombo con presencia de melanofagos.

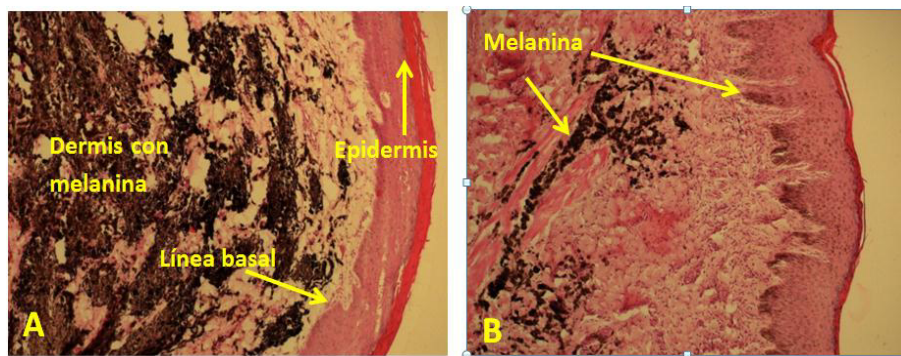


Figura 7. Hallazgos histológicos en melanomas. Cantidad de melanina presente en dermis. A) Se presenta la dermis con gran cantidad de melanina hasta la línea basal del melanoma. B) Focos de inflamación e infiltrado de melanina.

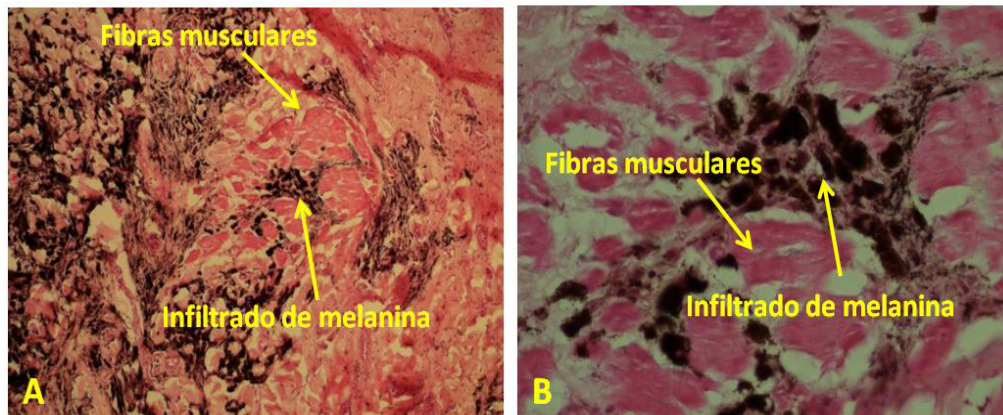


Figura 8. Hallazgos histológicos en melanomas. Fibras musculares. A y B) Infiltrado de una gran cantidad de melanina dentro de fibras musculares.

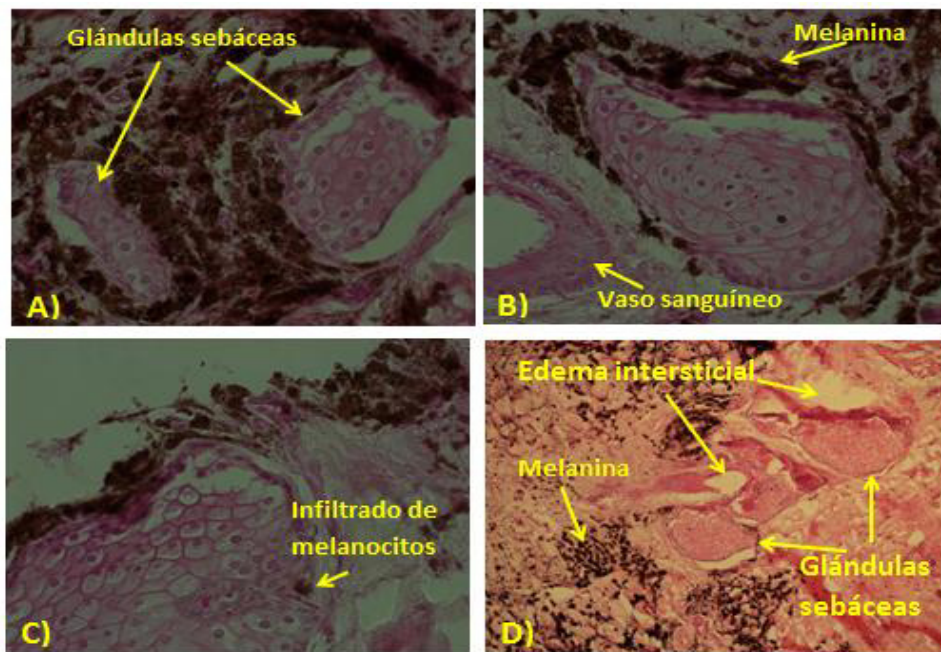


Figura 9. Hallazgos histológicos en melanomas. Glándulas sebáceas. A) Dos glándulas sebáceas mostrando una gran cantidad de melanina en su alrededor. **B)** Glándula sebácea rodeada de melanina junto a un vaso sanguíneo. **C)** Glándula sebácea con infiltrado de melanocitos. **D)** Glándulas sebáceas con edema intersticial junto a una gran cantidad de melanina.

4.1.2. Análisis histológico de Riñón:

En el análisis histológico de los riñones, éstos mostraron una arquitectura normal como se muestra en la (Fig. 10-A y B), en la cual se señalan los glomérulos y túbulos contorneados proximales, en la (Fig. 11) se muestran los túbulos contorneados proximales y distales.

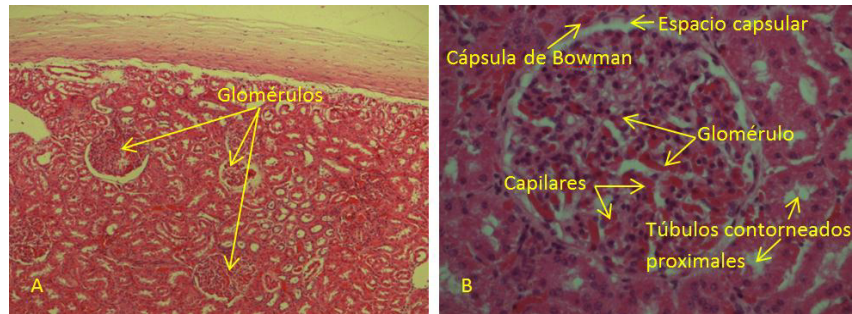


Figura 10. Riñones. Glomérulos: A) Glomérulos B) Descripción del glomérulo.

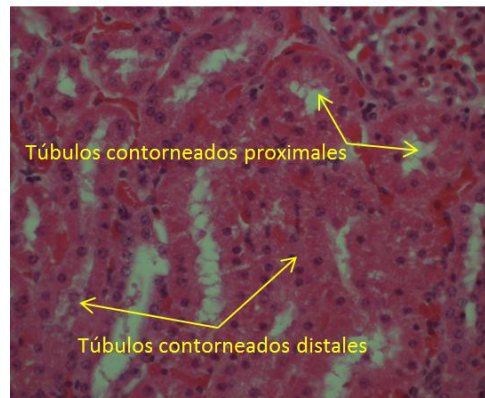


Figura 11. Riñón. Túbulos contorneados proximales y distales.

4.1.3. Análisis histológico de Piel normal:

Al analizar el tejido epitelial clasificado como sano, se observaron los los folículos pilosos con buena conformación (Fig. 12) así como una arquitectura normal de la glándula sebácea, la cual puede observarse en la (Fig. 13).

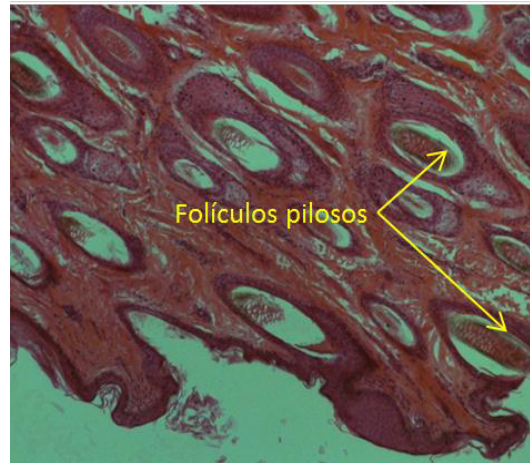


Figura 12. Piel. Folículos pilosos.

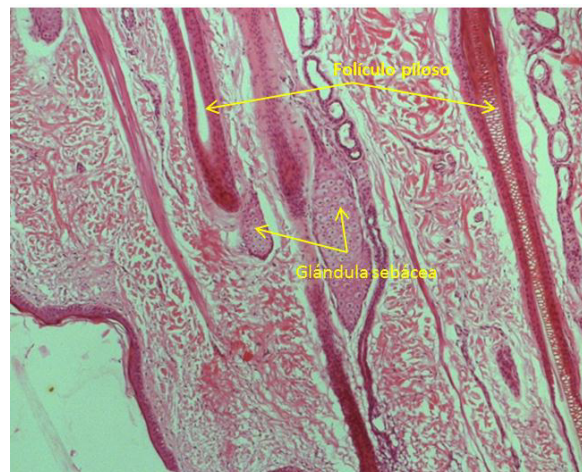


Figura 13 Piel. Folículos pilosos y Glándulas sebáceas. Folículos pilosos y Glándulas sebáceas.

4.2. RT-PCR para β -actina y expresión total de WT1:

Se analizó la integridad de los ADN complementarios de las muestras de melanoma, piel normal y riñón y del ADN de las muestras de sangre mediante la amplificación del gen constitutivo de B-actina, observándose la banda esperada de 280 pb en todas las muestras (Fig. 14).

En el análisis de la expresión del gen WT1, se logró la amplificación de la banda esperada de 800pb en las dos muestras de riñón, en las cuatro muestras de piel normal y en las dos muestras de sangre, todas las muestras de melanoma resultaron negativas (Fig. 14).

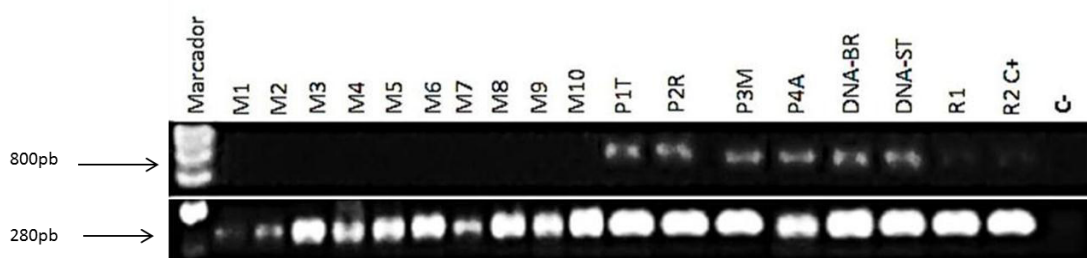


Figura 14. RT-PCR para WT1 y B-actina. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, Melanoma 1 (M1), Melanoma 2 (M2), Melanoma 3(M3), Melanoma 4 (M4), Melanoma 5 (M5), Melanoma 6 (M6), Melanoma 7 (M7), Melanoma 8 (M8), Melanoma 9 (M9), Melanoma 10 (10), Piel 1 Tordillo (P1T), Piel 2 Retinto (P2R,) Piel 3 Moro (P3M), Piel 4 Alazán (P4A) , DNA sangre Blue Roan (DNA-BR), DNA sangre tordillo (DNA-ST) Riñón 1, Riñón 2 C+ y Control negativo (C-).

4.3. Análisis de expresión de la proteína de WT1 por DOT BLOT:

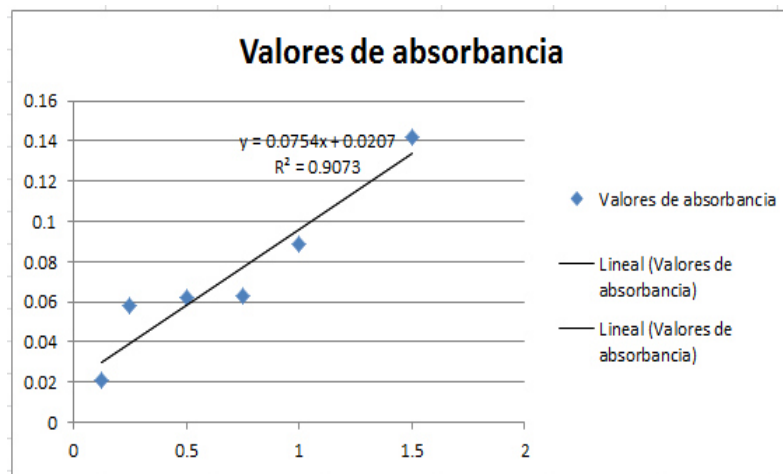
Se realizó la extracción de proteínas y su cuantificación por la técnica de Lowry (Tabla 2) y posteriormente se midió la absorbancia (cantidad de proteína que existe en la muestra) en relación con los estándares (Tabla 3) para finalmente realizar la curva de calibración (Grafica 1), la cual es la absorbancia en función de los estándares.

Muestras / Estándares de (seroalbúmina bovina)	Cuantificación $\mu\text{g/ml}$
Melanoma 6	3.27
Melanoma 9	2.88
Riñon 2	8.30
Piel 1 (P1T)	2.83
Piel 4 (P4M)	4.36
K562	5.61

Tabla 2. Cuantificación de proteínas.

Estándares	Valores de absorbancia
Estándar 0.125 $\mu\text{g/ml}$	0.021 μg
Estándar 0.25 $\mu\text{g/ml}$	0.058 μg
Estándar 0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.062 μg
Estándar 0.75 $\mu\text{g/ml}$	0.063 μg
Estándar 1 $\mu\text{g/ml}$	0.089 μg
Estándar 1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.142 μg

Tabla 3. Estándares y sus valores de absorbancia.



Grafica 1. Curva de calibración de proteínas.

Para la técnica de DOT BLOT PROTEIN para WT1, se analizaron 150µg de proteína de 5 muestras en total: (M6) melanoma 6, (M9) melanoma 9, (R2) riñón 2 (P1T) piel 1 Tordillo, (P4M) piel 4 Moro, usando como control positivo la línea celular de leucemia humana K562. Se probaron varias diluciones: Ac primario policlonal WT1 dilución 1:4000 y Ac secundario policlonal anti-conejo WT1 dilución 1:10000; Ac primario monoclonal B-actina dilución 1:15000 y Ac secundario monoclonal anti-ratón B-actina dilución 1: 5000, estandarizándose la técnica con una dilución 1:1000 del Ac primario policlonal WT1 y una dilución 1:10,000.del Ac secundario policlonal anti-conejo.

En el DOT BLOT para B-actina solo se observó positividad en la línea celular leucémica humana, esto debido a que el anticuerpo reconoce muestras de humanos, pero no de equinos (Fig. 15).

Al analizar la expresión de la proteína de WT1, se observó positividad en las dos muestras de piel normal analizadas (P1T y P4M) y en la línea leucémica K562 (control positivo), sin embargo en las dos muestras analizadas de melanoma (M6 y M9) y en la de riñón (R2) no se observó reacción (Fig. 15).

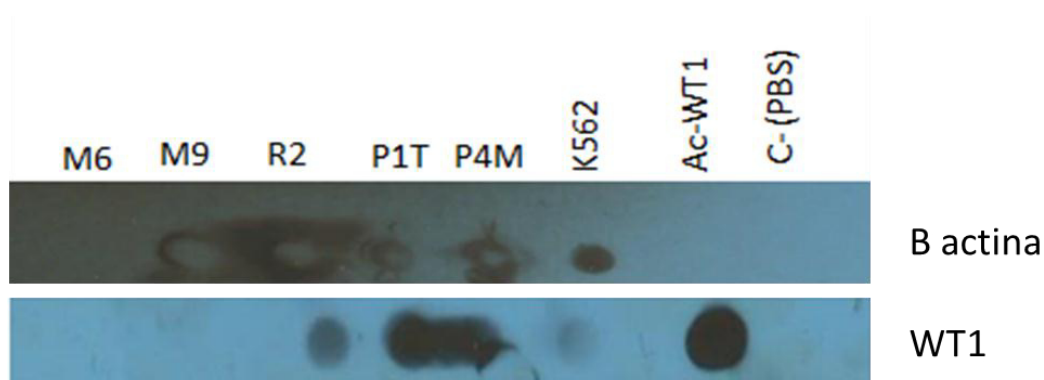


Figura 15. Revelado de la Técnica DOT BLOT para B-actina y WT1. (M6) melanoma 6, (M9) melanoma 9, (R2) riñón 2, (P1T) piel 1 tordillo, (P4M) piel 4 moro, (K562) línea celular de leucemia humana, Ac-WT1, C- Buffer Fosfato Salino (PBS).

4.4. Análisis de expresión de la proteína de WT1 por Inmunohistoquímica:

Como técnica adicional para corroborar los resultados obtenidos en el DOT BLOT y el PCR, se realizó la técnica de inmunohistoquímica, la cual, nos permite revisar la expresión de proteínas de interés en tejido. Al analizar las 10 muestras de melanoma previamente despigmentadas, éstas fueron negativas para la proteína WT1 como se muestra en la figura (Fig. 16-A, B, C, D) en las cuales se muestran los cortes más representativos de todas las muestras, sin embargo, se logró observar una escasa expresión de la proteína WT1 en una glándula sebácea (Fig. 16-E) y en la dermis (Fig. 16-F).

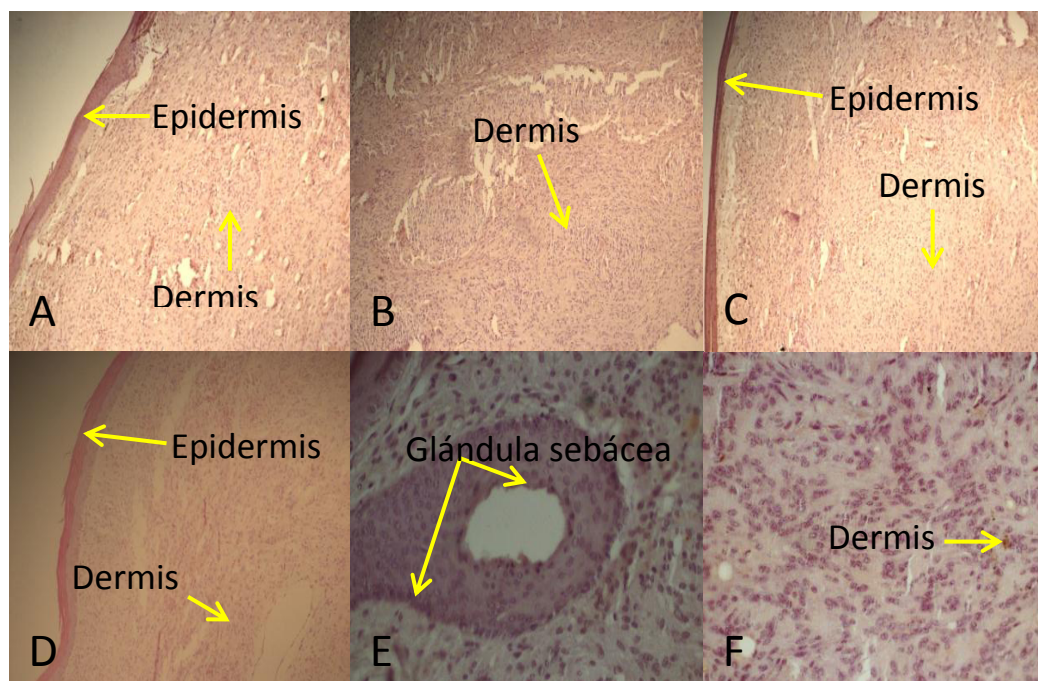


Figura 16. Inmunohistoquímica para WT1 en muestras de melanomas de equinos. En las fotografías (A, B, C, D) se observa negatividad. En las fotografías (E y F) se observa una glándula sebácea y una muestra de dermis respectivamente en donde se observa escasa expresión de WT1, ambas con un IBR de 1 (objetivo 40X).

Al analizar las muestras de piel normal, se logró observar la expresión de WT1 en un nivel de moderado a alto en las glándulas sebáceas (Fig. 17-A, B, C) y en los folículos pilosos (Fig. 17-A, D, E, F), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el RT-PCR y la técnica de DOT-BLOT.

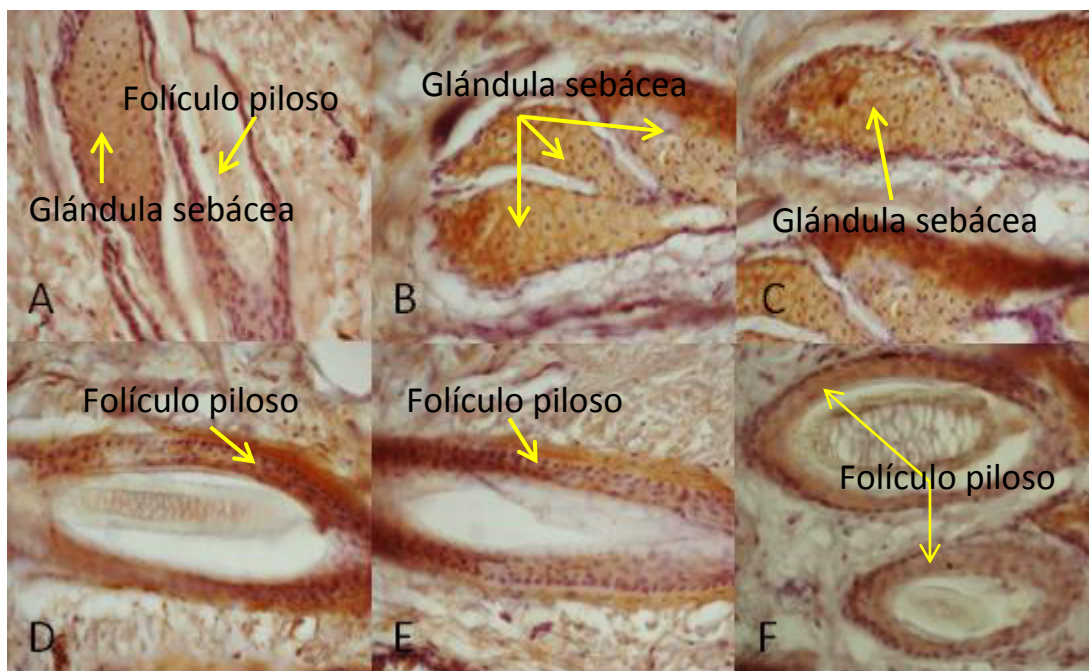


Figura 17. Inmunohistoquímicas para WT1 en muestras de piel normal de equinos (A-F). A) Muestra P1T en el cual se observa la expresión de WT1 en células sebáceas y en las células que forman el folículo piloso (objetivo 40x). B y C) Muestras P2R y P4M respectivamente en las cuales se muestran las glándulas sebáceas con una expresión moderada a alta de WT1 (objetivo 40x). D, E y F) P1T, P2R y P4M en las cuales se observan folículos pilosos con una expresión alta de WT1.

Las muestras de riñón fueron analizadas como un control positivo de expresión para WT1, observándose positividad con una expresión baja de WT1 en los glomérulos renales (Fig. 18).

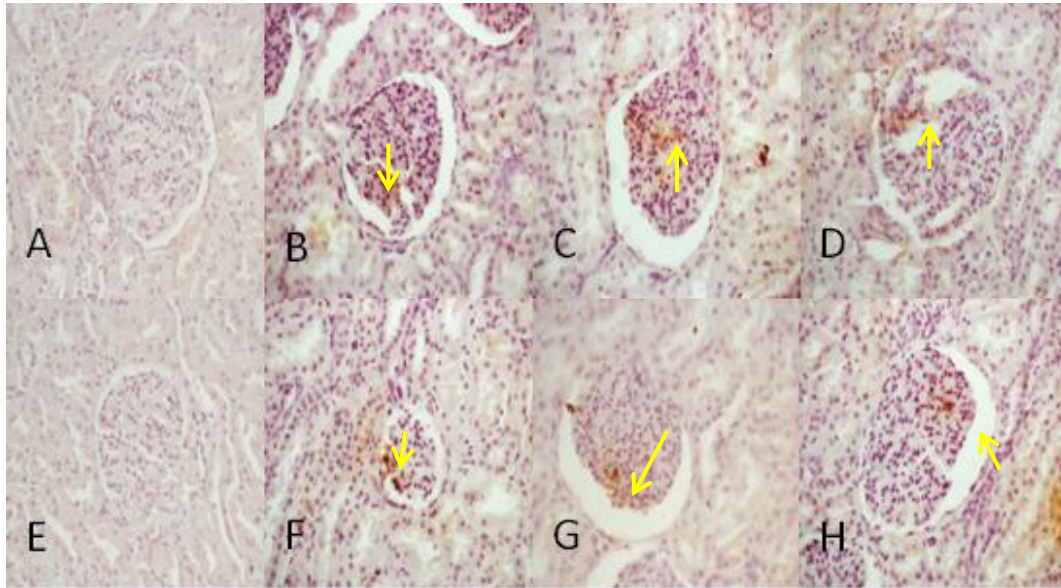


Figura 18. Inmunohistoquímica para WT1 en muestras de riñón de equinos (A-H). Las flechas muestran la localización de la proteína en cada uno de los glomérulos. **A y E)** control negativo. **B, C, D, F, G y H)** muestras renales con expresión baja de WT1, se observa la expresión en el glomérulo y en la pared de la capsula de Bowman.

Se calculó el Índice binario de reactividad (IBR) el cual nos permite conocer el grado de tinción y el número de células que se tiñen en una escala de 0 a 4, ambas medidas expresadas en porcentaje.

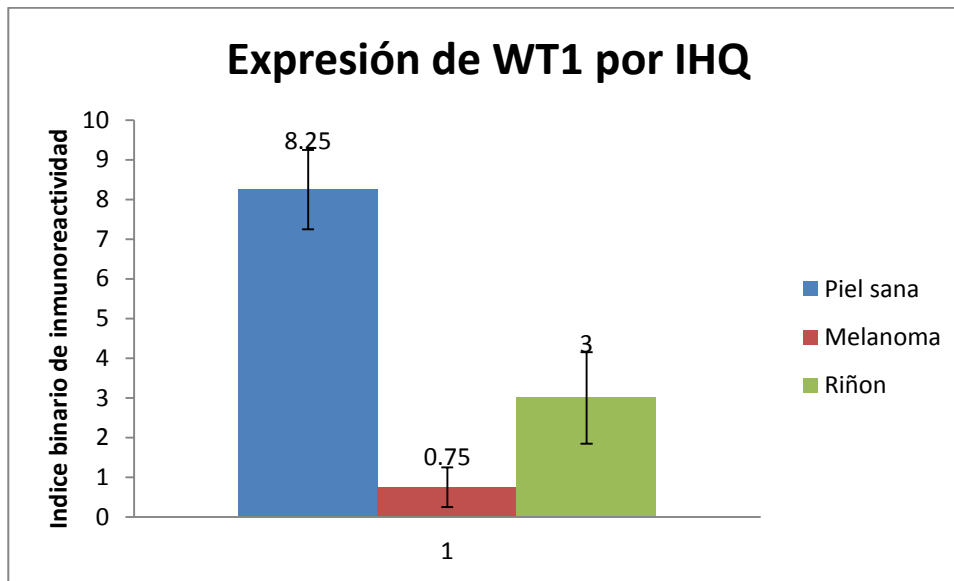
El IBR promedio para WT1 en los tejidos de piel sana fue de 8.25 (Grafica 2), lo que representa un grado de tinción de moderado a medio y un porcentaje de células teñidas de medio a alto. El IBR promedio para las muestras de riñón fue de 3, con una tinción de leve a moderada y un porcentaje de células teñidas moderada (Tabla 4).

Con los datos obtenidos para su desviación, esta se puede correlacionar con la técnica de T Student (χ^2).

Se puede tener una confianza del 95% que la desviación estándar poblacional cae dentro de sus intervalos de confianza, lo que nos sugiere que nuestros resultados son aceptables.

	%T	%C	IBR	promedio	dev est
Piel sana	3	3	9	8.25	2.87228132
	2	3	6		
	3	4	12		
	2	3	6		
Melanoma	1	1	1	0.75	0.5
	0	0	0		
	1	1	1		
	1	1	1		
Riñon	2	2	4	3	1.15470054
	1	2	2		
	2	2	4		
	1	2	2		

Tabla 4. IBR obtenido para las muestras de piel normal, melanoma y riñón.



Grafica 2. Expresión de WT1 por IHQ en piel, melanoma y riñón de equino. Se observa la diferencia de expresión de WT1 en los diferentes tejidos de equino, donde corroboramos la expresión de WT1 en piel con un IBR de 8.25, en contraste con riñón que tiene una expresión de 3 y en melanoma tiene 0.75 de expresión.

5. DISCUSIÓN

El gen WT1 en el humano inicialmente fue descrito como un gen supresor tumoral en nefroblastoma, sin embargo, actualmente es reconocido más como un oncogén ya que se encontró sobreexpresado en leucemia y en un gran número de tumores sólidos como lo es el caso de melanoma (Mrowka & Schedl, 2000), (Wagner , Schedl, & Wagner, 2008).

En humanos, se ha encontrado la expresión de WT1 en melanoma, pero no así en piel normal (Shin-ichi, y otros, 2006), sugiriendo que éste puede ser considerado como un marcador diagnóstico para este tipo de neoplasia. De igual forma, en una línea celular de melanoma murino (B16F10) se ha reportado una alta expresión de WT1 y su silenciamiento con ARN de interferencia induce muerte celular, concluyéndose así que la expresión de este gen es importante para la proliferación celular (Zamora-Ávila , y otros, 2009). En un modelo murino con cáncer pulmonar establecido con la línea B16F10 al que se administró ARNs de interferencia contra WT1 vía aerosol, se logró reducir el índice de la masa tumoral y aumentar la sobrevivencia de los ratones, concluyéndose que WT1 puede ser considerado como un buen blanco terapéutico para este tipo de neoplasia (Zamora-Ávila et. al, 2007).

En equinos, el melanoma es una de las neoplasias más comunes, se han analizado la expresión de algunos genes en esta patología tales como: STX17, NR4A3 (Sundstrom, y otros, 2011), Melan A, MAGE-1, MAGE.2, MAGE-3 y PCNA (Kamau Chapman, y otros, 2009), sin embargo, no existen estudios de la expresión del gen WT1 en esta patología para esta especie que nos permita dilucidar el posible rol biológico que desempeña y su analogía con otras especies.

En los resultados obtenidos en el presente estudio se encontró expresión de WT1 en riñón por RT-PCR e inmunohistoquímica, el cual fue incluido como

control positivo de expresión, específicamente a nivel de glomérulos, ya que este gen se expresa durante el desarrollo embrionario para dar lugar al sistema genitourinario, concordando con lo reportado para humanos (Mrowka & Schedl, 2000).

Se ha encontrado en cortes histológicos una gran similitud entre el melanoma del equino y el melanoma humano y por la técnica de inmunohistoquímica se ha demostrado que se pueden usar marcadores de uso humano para los equinos como los que detectan a S-100, PCNA, HMB-45, Ki-67, T-311 y CD44 (Heidemarie Seltenhammer Monika et al. 2004).

Al analizar las muestras de melanoma para WT1 éstas fueran negativas tanto por RT-PCR, DOT BLOT e Inmunohistoquímica, contrario a lo reportado en melanomas humanos en donde WT1 se encuentra altamente expresado predominantemente en el citoplasma de las células neoplásicas y una tinción nuclear en el tumor de Wilms y mesotelioma, reconociéndose a WT1 como un marcador para estas patologías (Garrido-Ruiz et al 2009).

De igual forma, contrario a lo reportado para humanos, se encontró expresión de WT1 en muestras de piel normal de equinos, encontrándose por inmunohistoquímica una fuerte tinción de WT1 a nivel del folículo piloso y en glándulas sebáceas, ésta expresión no ha sido reportada para ninguna otra especie.

Los resultados obtenidos en este proyecto, sugieren una supresión de la expresión del gen WT1 en melanoma, uno de los represores reportados de WT1 en piel son los PPARs.

Los PPARs (Receptores de proliferación de activación de Peroxisomas) son factores de transcripción activados por ligando que influyen fuertemente en la

señalización de células normales y cancerosas. Existe evidencia que éstos PPARs juegan un papel en la formación, reparación y carcinogénesis de la piel.

Los PPAR se expresan durante el desarrollo de la piel normal en la epidermis, los folículos pilosos y la glándula sebácea, en los humanos se expresan en la epidermis de adultos y en los roedores su expresión disminuye después del nacimiento (Michalik & Wahli, 2007).

Existen tres isoformas denominadas PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Se ha estudiado poco sobre el rol de los PPARs en los melanocitos y en el melanoma, particularmente el PPAR β . En un estudio se encontró expresión de PPAR β en muestras de melanoma humano y su activación farmacológica en líneas celulares de melanoma humanas y murinas induce una inhibición en la proliferación celular sin inducir apoptosis, ésta inhibición se encontró asociada a una baja en la expresión de WT1, demostrándose una represión por la unión directa de PPAR β al promotor de WT1 que resulta en la inhibición de los efectos de WT1 como promotor de la proliferación celular (Michiels et. al, 2010).

Nuestros resultados sugieren una posible represión de WT1 en melanoma equino, que contrastando con la literatura, pudiera ser por efecto de la expresión de PPAR β , sin embargo, es necesario ampliar el número de muestras de piel normal y melanoma para analizar la expresión de éstos PPARs y la interacción con WT1 para dilucidar el rol que éste gen juega en el melanoma equino.

6. CONCLUSIONES:

En este trabajo se analizó la expresión del gen WT1 en muestras de melanoma, piel sana y riñón de equinos, logrando concluir lo siguiente:

- El gen WT1 se encuentra altamente expresado en piel normal, específicamente en folículo y glándula sebácea.
- No se encontró expresión de WT1 en las muestras de melanoma equino analizadas por las diferentes técnicas.
- En riñón, se encontró expresión en niveles bajos en los glomérulos renales.
- Los resultados obtenidos indican que el gen WT1 podría encontrarse reprimido en melanoma equino por la expresión de los genes PPAR, específicamente PPAR β como lo reportado en algunas líneas celulares de melanoma humanas y murinas.

7. LITERATURA CITADA:

- Acosta, Á. E., E. Fierro, V. E. Velásquez, and X. Rueda, 2009, MELANOMA: patogénesis, clínica e histopatología: Rev Asoc col Dermatol, p. 87-108.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, 2010, Biología Molecular de la Célula, OMEGA.
- Andersson, L., R. Baumung, M. Binns, I. Curik, T. Druml, C. Fitzsimmons, A. Golovko, M. Grabherr, C.-H. Heldin, J. Lennartsson, K. Lindblad-Toh, G. Lindgren, G. R. Pielberg, F.
- Ponten, K. Sandberg, M. H. Seltenhammer, J. Solkner, S. Stromberg, E. Sundstrom, M. Vetterlein, and C. Wade, 2008, A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse: Nature Genetics, v. 40, p. 1004+.
- Barabas, K., R. Milner, D. Lurie, and C. Adin, 2008, Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications: Veterinary & Comparative Oncology, v. 6, p. 1-18.
- Barrie, K. B., D. E. Brooks, N. C. Scotty, and D. Taylor, 2008, Surgical management of a progressive iris melanocytoma in a Mustang: Veterinary Ophthalmology, v. 11, p. 75+.
- Bellone, R. R., 2010, Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses Bellone Effects of equine pigmentation genes: Animal Genetics, v. 41, p. 100-110.
- Bolin, D. C., 1999, Cutaneous neoplasms of horses: Eq Dis Quart, p. 7-9.
- Brouillette, J. A., J. R. Andrew, and p. J. Venta, 2000, Estimate of nucleotide diversity in dogs with a pool-and-sequence method: Mamm. Genome, p. 1079-1086.
- Brown, E. L., V. K. Ramiya, C. A. Wright, M. M. Jerald, A. D. Via, V. N. Kuppala, W. S. Hazell, P. D. Lawman, and M. J. Lawman, 2014, Treatment of Metastatic Equine Melanoma with a Plasmid DNA Vaccine Encoding Streptococcus Pyogenes EMM55 Protein: Journal of Equine Veterinary Science, v. 34, p. 704-708.

Bruggen, V. P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, D. E. Plaen, V. B. Eynde, A. Knuth, and T. Boon, 1992, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma: *Science*, p. 1643-7.

Bullwinkel, J., B. Baron-Luhr, A. Ludemann, C. Wohlenberg, J. Gerdes, and T. Scholzen, 2006, Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells: *J. Cell. Physiol*, p. 624-35.

Burden , K., 2011, Melanomas and their effect on the grey horse: *Young Scientists Journal*, p. 75-81.

Busam,K.J., & jungbluth, A.A.(1999). Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Am J Surg Pathol*, 12-8.

Busam, K. J., Chen, Y. T., Old, L. J., Stockert, E., Iversen, K., Coplan, K. A., y otros. (1998). Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol*, 976-82.

Cauley, C., J. Hawkins, S. Adams, and J. Fessler, 2002, Use of carbon dioxide laser for surgical management of cutaneous masses in horses: 32 cases (1993-2000): *J Am Vet Med Assoc*, p. 2-7.

Chavez- Escamilla, A. K., 2013, Efecto de la sobre expresion de WT1 en la expresion de genes angiogenicos en melanoma murino bajo condiciones normales y de hipoxia in vitro: Departamento de Biologia Molecular del Cáncer San Nicolás N.L.

Clarkson, K. S., I. C. Sturdess, and A. J. Molyneux, 2001, The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan A). : *J Clinic Pathol*, p. 196-200.

Comms, C., 2012, New data on MAGE-A3 cancer immunotherapy support potential novel options of treating non-small cell lung cancer and melanoma: Us.gsk.com, p. 10-16.

Crowson, A. N., C. M. Magro, and M. C. Mihm Jr, 1999, Malignant melanoma with prominent pigment synthesis: “Animal type” melanoma—A clinical and histological study of six cases with a consideration of other melanocytic neoplasms with prominent pigment synthesis: *Human Pathology*, v. 30, p. 543-550.

Curik, I., T. Drumi, M. Seltenhammer, E. Sundstrom, G. R. Pielberg, L. Andersson, and J. Solkner, 2013, Complex Inheritance of Melanoma and Pigmentation of Coat and Skin in Grey Horses *PLOS GENETICS*.

Davis, E. G., and B. R. Rush, 2013, Diagnostic challenges: Equine thoracic neoplasia: *Equine Veterinary Education*, v. 25, p. 96-107.

Finocchiaro, L. M. E., M. D. Riveros, and G. C. Glikin, 2009, Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as adjuvant treatments of metastatic melanoma in a horse, p. 278-279.

Fleury, C., F. Berald, A. Leblond, C. Faure, N. Ganem, and L. Thomas, 2013, The study of cutaneous melanomas in Camargue-type gray-skinned horses: *Pigment Cell Res*, p. 47-51.

Garrido-Ruiz, M. C., S. M. Rodriguez-Pinilla, B. Pérez-Gómez, and J. L. Rodríguez-Peralto, 2009, WT1 expresion in nevi and melanomas: a marker of melanocytic invasion into the dermis: *Journal of Cutaneous Pathology*, p. 542-548.

Gure, A. O., R. Chua, B. Williamson, M. Gonen, C. A. Ferrara, S. Gnjjatic, G. Ritter, J. G. Simpson-Andrew, Y. T. Chen, L. J. Old, and N. K. Altorki, 2005, Cancer-Testis Genes Are Coordinately Expressed and Are Markers of Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer: *Clinical Cancer Research*, p. 8055-8062.

Guy, Y., J. A. Toretsky, A. B. Campbell, and A. E. Eskenazi, 2000, Recognition of Common Childhood Malignancies: *Am Fam Physician*, p. 2144-2154.

Hahn, w. c., F. Dunn-lan, Y. Kim-So, C. Schinzel-Anna, R. Firestein, Gueney-isil, S. Boehm-Jesse, C. William, F. Hahn-lan, Dunn-So, Young-Kim, C. Anna, F. Schinzel-ron, and J. S. Isil-Gueney, 2009, Integrative genomic approaches to understanding cancer: *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 478-484.

Hass, N. K., S. M. Smalley-Keiran, L. Ling, and M. Herlyn, 2005, Adhesion, migration and comunication in melanocytes and melanoma: *Pigment Cell Res*, p. 150-159.

Heidemarie Seltenhammer, M., Heere-Ress, E., Brandt, S., Drauml, T., Jansen, B., Pehamberger, H., y otros. (2004). Comparative Histopathology of Grey-Horse-Melanoma and Human Malignant Melanoma. *Pigment Cell Res*, 674-681.

Heinzerling, L. M., F. Karsten, R. Stefan , A. K. Margarete, D. Reinhard, G. Stranzinger, and K. Moelling, 2000, Tumor regresion induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses: *J Mol Med*, p. 692-702.

Hewes, C. A., and K. E. Sullins, 2006, Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004): *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 229, p. 1617-1622.

Hunter, R. P., C. R. Short, M. J. Myers, D. E. Farrell, J. R. McClure, C. E. Koch, and M. L. Keowen, 2007, The Effect of Cimetidine and Aminoguanidine on Pro-inflammatory Cytokines in the Horse: *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 27, p. 307-312.

Jorge-Buys, D. L., C. O. Lara-Torres, and C. Ortiz-Hidalgo, 2007, Interpretación básica de inmunohistoquímica. características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular *Patología*, p. 126-40.

Kamau Chapman, S. W., N. Metzger, P. Grest, K. Feige, B. V. Rechenberg, J. A. Auler, and M. O. Hottinger, 2009, Isolation, establishment, and characterization of ex vivo equine melanoma cell cultures: *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, p. 152-162.

- Kane, E., 2006, Investigating cancer: DVM: The Newsmagazine of Veterinary Medicine, v. 37, p. 7E-7E.
- Kavar, T., E. Čeh, and P. Dovč, 2012, A simplified PCR-based method for detection of gray coat color allele in horse: Molecular and Cellular Probes, v. 26, p. 256-258.
- Laus, F., M. Cerquetella, E. Paggi, G. Ippedico, M. Argentieri, G. Castellano, A. Spaterna, and B. Tesei, 2010, EVALUATION OF CIMETIDINE AS A THERAPY FOR DERMAL MELANOMATOSIS IN GREY HORSE: Israel Journal of Veterinary Medicine, v. 65, p. 48-52.
- Lembcke, L. M., S. A. Kania, J. T. Blackford, D. J. Trent, A. Odoi, D. A. Grosenbaugh, D. G. Fraser, T. Leard, and J. C. Phillips, 2012, Development of Immunologic Assays to Measure Response in Horses Vaccinated with Xenogeneic Plasmid DNA Encoding Human Tyrosinase: Journal of Equine Veterinary Science, v. 32, p. 607-615.
- Li, B., X.-l. He, Y.-p. Zhao, Q.-n. Zhao, Unierhu, D.-y. Bai, and D. Manglai, 2014, Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in Mongolian horse: Livestock Science, v. 167, p. 58-64.
- Lin, J., C. Campagne, E. Sundström, P. Sousa, S. Imran, M. Seltenhammer, G. Pielberg, M. J. Olsson, G. Egidy, L. Andersson, and A. Golovko, 2014, Constitutive activation of the ERK pathway in melanoma and skin melanocytes in Grey horses: BMC Cancer, v. 14, p. 1-24.
- Marenholz, I., C. Heizmann, and G. Fritz, 2004, S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature): Biochem Biophys Res Commun, p. 1111-22.
- Martínez de Merlo, E. M., 2012, Introduccion al diagnostico en oncologia equina: Revista complutense de ciencias veterinarias, p. 2-11.
- Michalik, L., & Wahli, W. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. . *Biochism Biophys Acta*, 991-998.

Michiels, J.-F., C. Perrin, N. Leccia, D. Massi, P. Rimaldi, and N. Wagner, 2010, PPARB activation inhibits melanoma cell proliferation involving repression of the Wilms' tumor suppressor WT1: *Molecular and Genomic Physiology*, p. 689-703.

Moldovan, G. L., B. Pfander, and S. Jentch, 2007, PCNA, the maestro of the replication fork: *Cell*, p. 665-679.

Mrowka, C., & Schedl, A. (2000). wilms' Tumor Suppressor Gene WT1: From Structure to Renal Pathophysiologic Features. *J Am Soc Nephrol*, 106-115.

Muñoz-Chapuli, R., R. Carmona, M. Gonzalez-Iriate, D. Macias, and J. M. Perez-Pomares, 2003, Las múltiples caras del gen WT1: funciones en el desarrollo e implicaciones clínicas: *Acta pediátrica de México*, p. 29-38.

Patterson-Kane, J. C., L. C. Sánchez, E. W. Uhl, and L. M. Edens, 2001, Disseminated metastatic intramedullary melanoma in an aged Grey Horse. : *J Comp Path*, p. 204-207.

Pavlin, D., M. Cemazar, G. Sersa, and N. Tozon, 2012, IL-12 based gene therapy in veterinary medicine: *Journal of Translational Medicine*, v. 10, p. 234.

Phillips, J., 2015, Chapter 125 - Melanoma, *in* K. A. S. E. Robinson, ed., *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine (Seventh Edition)*: St. Louis, W.B. Saunders, p. 524-527.

Rahmanzadeh, R., G. Huttman, J. Gerdes, and T. Scholzen, 2007, Chromophore-assisted light inactivation of pki-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis: *Cell Prolif*, p. 422-30.

Scacco, L., C. Bolaffio, A. Romano, M. Fanciulli, A. Baldi, and E. P. Spugnini, 2013, Adjuvant Electrochemotherapy Increases Local Control in a Recurring Equine Anal Melanoma: *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, p. 637-639.

Schaffer, P. A., B. Wobeser, L. E. R. Martin, M. M. Dennis, and C. G. Duncan, 2013, Cutaneous neoplastic lesions of equids in the central United States and Canada:

3,351 biopsy specimens from 3,272 equids (2000-2010): Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 242, p. 99-104.

Schamhost, V., A. J. Vander E, and A. G. Jochemsen, 2001, WT1 proteins: functions in growth and differentiation: Gene, p. 141-161.

Scott, D., and W. Miller, 2003, Neoplastic and non-neoplastic tumors: Equine dermatology, p. 698-795.

Seltenhammer, M. H., E. Heere-Ress, S. Brandt, T. Druml, B. Jansen, H. Pehamberger, and G. W. Niebauer, 2004, Comparative Histopathology of Grey-Horse-Melanoma and Human Malignant Melanoma: Pigment Cell Research, v. 17, p. 674-681.

Seltenhammer, M. H., M. H. Simhofer, S. Scherzer, R. Zecher, I. Curik, and J. Solkner, 2003, Equine melanoma in a population of 296 grey horses: Equine Vet, p. 153-157.

Seltenhammer, M. H., E. Sundstrom, C. Meisslitzer-Ruppitsch, P. Cejka, J. Kosiuk, J. Neumuller, M. Almeder, O. Majdic, P. Steinberger, U. M. Losert, J. Stockl, L. Andersson, J. Solkner, M. Vetterlein, and A. Golvko, 2014, Establishment and characterization of a primary and metastatic melanoma cell line from Grey Horses: In Vitro Cell Dev Biol Animal, p. 56-65.

Semenza, G. L., 2003, Targeting HIF-1 for cancer therapy: Nat Rev Cancer, p. 721-32.

Shin-ichi, N., o. Yusuke, H. Tetsuya , K. Takayoshi, K. Michio, T. Tamotsu , K. Kiyoshi, k. Yuko, Y. Akira, O. Meinoshin , K. Yayoi, O. Yoshihiro, K. Ichiro, S. Haruo, and A. Katsuyuki 2006, Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells: Modern Pathology, p. 804-814.

Spring, F. A., R. Dalchau, G. L. Daniels, G. Mallinson, P. A. Judson, S. F. Parsons, J. W. Fabre, and D. J. Anstee, 1988, The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In (Lu) gene: Immunology, p. 37-43.

Suchak, R., O. A. Hameed, and A. Robson, 2014, Evaluation of the role of routine melan-A immunohistochemistry for exclusion of microinvasion in 120 cases of lentigo maligna: *Am J Dermatopathol*, p. 387-91.

Sundstrom, E., F. Imsland, S. Mikko, C. Wade, S. Sigurdsson, G. R. Pielberg, A. Golovko, I. Curik, M. H. Seltenhammer, J. Solkner, K. Lindblad-Toh, and L. Andersson, 2012, Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses: *BMC Genomics*, v. 13, p. 365.

Sutton, R., and G. Coleman, 1997, Melanoma and the Graying Horse: Research Paper Series, p. 1-34.

Theon, Pascoe, Carlson, and Krag, 2002, Intratumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses: *J Am Vet Med Assoc*, p. 261-267.

Valentine, B., 2006, Survey of equine cutaneous neoplasia in the pacific Northwest: *J Vet Diagn Invest*, p. 123-126.

Vogel , A. M., A. M. Gown, D. Hoak, F. Gough, and M. A. McNutt, 1986, Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes: *Am.J. Pathol*, p. 195-203.

Wagner, K. D., N. Wagner, S. Wellmann, G. Schley, A. Bondke, and H. Theres, 2003, Oxygen regulated expression of the Wilms tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): *FASEBj*, p. 1364-1366.

Wagner, N., J. F. Michiels, A. Schedl, and K. D. Wagner, 2008, The Wilms tumor suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expresion in tumor vessels in vivo: *Oncogne*, p. 3662-3672.

Zachary, J. F., and D. M. McGavin, 2013, chapter 6: Neoplasia and Tumor Biology, *Pathologic Basis of Veterinary Disease* p. 289,309.

Zamora-Avila , D. E., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M. A., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Avila, L. M., Resendez-Perez, D., y otros. (2009). WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther*, 892-9.

Zamora-Avila, D. E., M. A. Franco-Molina, L. M. Trejo-Avila, C. Rodriguez-Padilla, D. Resendez-Perez, and P. Zapata-Benavides, 2007, RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line: *Melanoma Res*, p. 341-348.

Zhen-Zhen, Z., D. L. Duffy, S. A. Thomas, N. G. Martin, N. K. Hayward, and G. W. Montgomery, 2009, Polymorphisms in the syntaxin 17 gene are not associated with human cutaneous malignant melanoma: *Melanoma Res*, p. 80-86.